

LOKALISATION VON TRANSFER RNA GENEN
DURCH «IN SITU» HYBRIDISIERUNG BEI
DROSOPHILA MELANOGASTER

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II
DER UNIVERSITÄT ZÜRICH

von

THOMAS SCHMIDT

aus ZÜRICH und WETZWIL (ZH)

Ausgeführt unter der Leitung von
Herrn PD Dr.E.Kubli

und begutachtet von
Herrn Prof. Dr.P.S.Chen

Zoologisches Institut
der Universität Zürich

Copy Corner 1980

1981

**LOKALISATION VON TRANSFER RNA GENEN
DURCH «IN SITU» HYBRIDISIERUNG BEI
DROSOPHILA MELANOGASTER**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

**PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II
DER UNIVERSITÄT ZÜRICH**

von

THOMAS SCHMIDT
aus ZÜRICH und WETZWIL (ZH)

Ausgeführt unter der Leitung von
Herrn PD Dr.E.Kubli

und begutachtet von
Herrn Prof. Dr.P.S.Chen

Zoologisches Institut
der Universität Zürich

Copy Corner 1980



Herrn PD Dr.E.Kubli gilt mein erster Dank für die Leitung und die Förderung dieser Arbeit. Herrn Prof.Dr. P.S.Chen danke ich für das fortwährende Interesse, das er ihr entgegenbrachte. Allen andern Institutsangehörigen - vorab Robert Dudler, Marianne Bienz und Martin Altwegg - welche durch Zusammenarbeit und Anregung den Gang dieser Arbeit beeinflusst haben, möchte ich herzlich danken.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODEN	7
1. <u>Drosophila</u> -Zuchten und Präparation der Speichel- drüsenchromosomen	7
2. Isolation, Fraktionierung und radioaktive Markie- rung der Nukleinsäuren	7
2.1. Ribonukleinsäuren	7
2.1.1. Transfer-RNA Isolation und Vorfraktionierung	7
2.1.2. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	8
2.1.3. Aminoacylierung	9
2.1.4. Reversed-phase Chromatographie	9
2.1.5. Fingerprintanalysen gereinigter tRNA- Fraktionen	10
2.1.6. Iodierung von tRNA mit Na ¹²⁵ I	10
2.1.7. Präparation von ³² P markierter tRNA aus Zellkulturen	11
2.2. Desoxyribonukleinsäuren	11
2.2.1. Isolation der DNA	11
2.2.2. Restriktionsenzymverdauungen	12
2.2.3. Agarosegelelektrophorese	12
2.2.4. Uebertragung von DNA-Restriktionsfragmen- ten auf Nitrocellulosefilter	13
3. Hybridisierungen	13
3.1. "In situ" Hybridisierung ¹²⁵ I markierter tRNA an polytäre Speicheldrüsenchromosomen von <u>Dro- sophila melanogaster</u>	13
3.2. Hybridisierung von ¹²⁵ I-tRNA an DNA-Restrik- tionsfragmente	15
RESULTATE	
1. Isolation der einzelnen tRNA-Spezies	16
1.1. Sepharose 4B Chromatographie	16
1.2. Chromatographische Reinigung der tRNA ^{Glu} ₄ und tRNA ^{ASP} ₂₆	16

1.3. DBAE-Cellulose Chromatographie	18
1.4. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2-D PAGE)	20
2. Identifikation der einzelnen Isoakzeptoren	23
2.1. Transfer-RNA ^{Glu} ₄	24
2.2. Transfer-RNA ^{Asp} ₄	24
2.3. Transfer-RNA ^{Asn} ₂₀ , tRNA ^{His} und tRNA ^{Ala} ₅₇	24
3. Fingerprintanalysen	28
4. Iodierung und "in situ" Hybridisierung	28
4.1. Transfer-RNA ^{Glu} ₄	30
4.2. Transfer-RNA ^{Asp} ₄	31
4.3. Transfer-RNA ^{Asn} ₂₀ , tRNA ^{His} und tRNA ^{Ala} ₅₇	31
5. Analyse von tRNA spezifischen Genom-DNA Restriktionsfragmenten	38
DISKUSSION	42
ZUSAMMENFASSUNG	51
ABKUERZUNGEN	53
LITERATUR	54

E I N L E I T U N G

Die wichtigste Aufgabe, die transfer-Ribonukleinsäuren in prokaryontischen und eukaryontischen Zellen zu erfüllen haben, liegt unbestritten in der Uebertragung genetischer Information von der Nukleinsäure-Sprache der messenger RNA in die Aminosäure-Sprache der Proteine. Die vielfältigen Interaktionen der tRNA mit den Komponenten des proteinsynthetisierenden Apparates sind im Detail von Rich und RajBhandary (1976) und Pongs (1978) beschrieben worden. Neben ihrer klassischen, zentralen Rolle kann die tRNA jedoch noch weitere Funktionen übernehmen (LaRossa und Söll, 1978; Cortese, 1979). In einigen Reaktionen dient sie als Aminoacyl-Donor ohne Beteiligung der üblichen Faktoren der Proteinsynthesemaschinerie. Die Synthese eines Glycylipopopolysaccharides (Gentner und Berg, 1971), die terminale Addition von Aminosäureresten an Proteine (Deutch et al., 1977) und die Mitwirkung einer Glycyl-tRNA ($\neq$ Proteinsynthese tRNA^{Gly}!) an der Biosynthese der Zellwand von Staphylococcus epidermidis (Roberts, 1972) seien hier als Beispiele erwähnt. Daneben kann tRNA auch an Prozessen teilnehmen, die in keinem Zusammenhang mit der Synthese von Proteinen und Polysacchariden stehen (Cortese, 1979). Transfer-RNA^{Trp} wirkt im Rous Sarcoma Virion als Primer für die "reversed transcriptase" (Haseltine et al., 1977) und von denselben Autoren wird vorgeschlagen, dass tRNA^{Trp} als strukturelles Element bei der Verpackung der viralen RNA ins Virion eine Rolle spielen könnte.

Bedeutende Funktionen können von tRNA's überall dort übernommen werden, wo sie direkt oder indirekt in die Regulation der Genexpression eingreifen. Der bei Prokaryonten gut untersuchte Mechanismus des "stringent control", wo unbeladene tRNA-Moleküle Signale einer Reihe regulativer Prozesse bilden (Gallant und Lazzarini, 1976) und die Beteili-

gung von tRNA's, wie im Falle von tRNA^{His} und tRNA^{Trp}, an der Regulation der Operons der kognaten Aminosäuren (Cortese, 1979), muss in diesem Zusammenhang erwähnt werden. Auch in eukaryontischen Systemen scheint unbeladene tRNA als Signal bestimmter regulatorischer Prozesse zu wirken. Erhöhte Konzentration deacylierter tRNA^{His} löst in Säugerzellen Reaktionen aus, die den Vorgängen des "stringent control" von Prokaryonten ähnlich sind (Grummt und Grummt, 1976).

Wichtig in diesem Zusammenhang sind auch Beobachtungen über spezifische Änderungen von tRNA-Isoakzeptor Konzentrationen im Verlaufe der Differenzierung einzelner Zellen (Friend Leukemia Zellen; Lin und Agris, 1980), während des Entwicklungsprozesses von Organen (Seidendrüsen von Bombyx mori; Garel et al., 1970) und in Korrelation zur Ontogenese ganzer Organismen (Drosophila melanogaster; White et al., 1973a). Erwähnenswert ist ebenfalls der hohe Grad der posttranskriptionalen Modifikation eukaryontischer tRNA's (Agris und Söll, 1977; Nishimura, 1979) und Änderungen des Modifikationsgrades im Verlaufe von Differenzierung (Lin et al., 1980), Entwicklung (White et al., 1973b) und Alterung (Hosbach und Kubli, 1979) von eukaryontischen Organismen. Experimentelle Daten dieser Art sind Hinweise dafür, dass auch bei höheren Eukaryonten die tRNA neben der Synthese von Proteinen entwicklungsbiologisch relevante Funktionen übernehmen könnten. Weiterführende Untersuchungen über den Aufbau, die Anordnung, die Expression und die Regulation von tRNA-Genen sind jedoch notwendig und können Wesentliches zur Klärung entwicklungsbiologischer Mechanismen beitragen.

Drosophila melanogaster erweist sich als geeigneter Organismus für Untersuchungen der Organisation und Funktion von tRNA-Genen. Genetisch (Lindsley und Grell, 1972), entwicklungsbiologisch (Gehring, 1976) und biochemisch-molekularbiologisch (Dickinson und Sullivan, 1975) ist Drosophila seit Jahren eingehend untersucht und charakterisiert. Ele-

gante genetische Methoden erlauben die Manipulation des Genoms: z.B. können an beinahe beliebigen Stellen Defizienzen und Duplikationen eingeführt werden (Lindsley und Sandler et al., 1972). Die Existenz von polytänen Chromosomen in Speicheldrüsen und einigen weiteren Geweben von Drosophila ermöglichen mittels "in situ" Hybridisierung das Studium der tRNA-Genorganisation auf der Ebene des Genoms.

Die Anzahl tRNA-Gene pro haploides Genom von Drosophila ist von Ritossa et al. (1966a) mit 750 und von Weber und Berger (1976) mit 590 bestimmt worden. Die Zahl der verschiedenen Basissequenzen kann auf Grund von RNA:DNA Hybridisierungsexperimenten mit etwa 60 angegeben werden (Weber und Berger, 1976). Das bedeutet einerseits, dass ein Teil der rund 100 Drosophila tRNA-Isoakzeptoren, die mittels RPC-5 Chromatographie unterschieden werden können (White et al., 1973a), allein durch partielle, posttranskriptionale Modifikation entsteht, d.h. von Genen mit identischer Sequenz abgelesen werden. Andererseits ist diesen Zahlen zu entnehmen, dass tRNA-Gene im Durchschnitt 10 - 13fach reiteriert im Genom von Drosophila vorliegen müssen.

Die zentrale Frage der vorliegenden Arbeit betrifft die Anordnung der tRNA-Gene im Genom von Drosophila melanogaster. Sind alle tRNA-Gene an einem einzigen Locus zusammengefasst, ähnlich wie die rRNA- (Ritossa et al., 1966b) oder die 5S RNA-Gene (Wimber und Steffensen, 1970) oder verteilen sie sich über das gesamte Genom? Sind die Gene einzelner tRNA-Familien (z.B. alle tRNA^{Asn}-Isoakzeptoren) an der selben cytologischen Stelle zu finden? Wie verhält es sich in dieser Beziehung mit einzelnen Isoakzeptoren? Lässt sich aus der Anordnung der tRNA-Gene eine bestimmte Regel ableiten? Stimmen die tRNA-Loci mit einzelnen, vermeintlichen "tRNA-Mutanten" (Minutes) oder mit Suppressor-Mutanten überein?

Die genetische Lokalisation redundanter Gene, wie zum Beispiel die der Histonproteine, der 5S RNA oder der tRNA,

ist problematisch, da Mutationen in einzelnen Genen kaum zu entdecken sind. Im Falle von Mutationen des bb-Locus (= rDNA-Deletionen; Ritossa et al., 1966b) oder bei den mini-Mutanten (=teilweise defizient für 5S RNA-Gene; Procunier und Tartof, 1975) werden partielle Defizienzen redundanter Gene phänotypisch manifest. Oft wirken sich aber derartige Mutationen letal auf den Organismus aus. Mit der von Gall und Pardue (1969) und von John et al. (1969) entwickelten Methode der "in situ" Hybridisierung von RNA an polytäre Speicheldrüsenchromosomen von Drosophila, bei der die Identifikation eines genetischen Locus ohne die mutierte Form dieses Gens möglich ist, lassen sich diese Schwierigkeiten in eleganter Art und Weise umgehen. Voraussetzung ist lediglich ein radioaktiv markiertes, primäres Genprodukt (RNA) oder das Gen mit seinen flankierenden Sequenzen (DNA). Mittels Autoradiographie können die spezifischen Bindungsstellen innerhalb des Genoms nachgewiesen werden. Mit der von Commerford (1971) entwickelten "in vitro" Iodierungsreaktion von RNA und DNA erzielt man die notwendige spezifische Radioaktivität der Hybridisierungsprobe. Die hohe, laterale Redundanz der DNA von polytären Speicheldrüsenchromosomen von Drosophila melanogaster erlaubt es auch, kurze Gene von relativ niedrigem Reiterationsgrad, z.B. tRNA-Gene, zu erfassen.

Die Klasse der Minute-Mutanten von Drosophila ist von Atwood (Ritossa et al., 1966b) in einer interessanten Hypothese mit Deletionen von tRNA-Genen in Verbindung gebracht worden. White (1974) untersuchte das Isoakzeptorenprofil verschiedener Minute-Mutanten mittels RPC-5 Chromatographie. Ausser der Mutation M(3)h^V, die eine reduzierte tRNA₃^{Thr}-Fraktion aufwies, konnte er keine Unterschiede zum Wildtypmuster aufzeigen. Steffensen und Wimber (1971) hybridisierten unfraktionierte ³H-tRNA an Speicheldrüsenchromosomen von Drosophila. Ihre Ergebnisse liessen aber keine eindeutigen Schlüsse über mögliche Korrelationen zwischen Minute- und tRNA-Loci zu.

Erste Versuche, tRNA-Gene von Drosophila mittels "in vitro"iodierter tRNA zu lokalisieren, wurden von Grigliatti et al. (1974) durchgeführt. "Genloci" der tRNA₅^{Lys} wurden bei 48F-49A und bei 56EF gefunden. Konkurrenzexperimente mit kalter 5S RNA zeigten jedoch, dass nicht ¹²⁵I-tRNA₅^{Lys} sondern kontaminierende ¹²⁵I-5S RNA für die Markierung über 56EF verantwortlich gemacht werden konnte (Grigliatti et al., 1974). "In situ" Hybridisierungen mit neuen Präparationen der ¹²⁵I-tRNA₅^{Lys} zeigten starke Markierung der Regionen 84AB und 87B nicht aber bei 48F-49A (Hayashi et al., 1980). Diese widersprüchlichen Daten wurden dahingehend interpretiert, dass in den Versuchen von Grigliatti et al. (1974) eine kontaminierende tRNA-Fraktion und nicht tRNA₅^{Lys} die Markierung der Region 48F-49A bewirkt hatte. Die Hauptschwierigkeit bei diesen Experimenten schien in der Isolation einer reinen tRNA-Fraktion mit den üblichen säulenchromatographischen Methoden zu liegen. Spuren störender ¹²⁵I-RNA-Fraktionen konnten nie ausgeschlossen werden. In eigenen Versuchen wurde daher versucht, spezifische Isolationsverfahren zu verwenden. Für den Isoakzeptor tRNA₄^{Glu} wurde eine Anticodon-Anticodon Affinitäts-Chromatographie (Grosjean et al., 1973) und für tRNA₂₀^{Asp} eine Concanavalin A Sepharose Chromatographie (Egg, 1978) verwendet.

Vier tRNA-Spezies von Drosophila melanogaster zeichnen sich durch die hypermodifizierte Base Q an der ersten Stelle im Anticodon aus: tRNA_{Asn}, tRNA_{His}, tRNA_{Asp} und tRNA_{Tyr} (White et al., 1973b ; Q = 7 - (4,5 - cis - dihydroxy - 1 - cyclopenten - 3 - ylaminomethyl) - 7 - deazaguanosin; Q* = Q + Hexoserest, kovalent an Cyclopentendiolgruppe gebunden). Das Ausmass der Modifikation ändert sich im Verlaufe der Entwicklung (White et al., 1973a) und des Alterns (Hosbach und Kubli, 1979) bei allen vier Spezies in ähnlicher Weise. In Arbeiten von Grosjean et al., (1978) konnte eine stabilisierende Wirkung der Q-Base im Anticodon-Anticodon-Komplex nachgewiesen werden und Harada und Nishimura (1972) konnten zei-

gen, dass Codonen mit U in der "Wobble"-Position stärker an Anticodonen mit der Base Q binden. Obschon die "in vivo" Funktion von Q unklar ist, heben sich die vier genannten tRNA-Spezies durch diese gemeinsame Modifikation im Anticodon als klar abgegrenzte Gruppe von den übrigen tRNA's ab.

Das von Egg (1978) zum ersten Mal auf Drosophila tRNA angewendete Isolationsverfahren mittels Polyacrylamidgelelektrophorese erlaubt die Reindarstellung jeder beliebigen tRNA-Spezies. Damit wurde es möglich, auch ohne spezifische Trennmethode reine tRNA-Fractionen zu erhalten und die Genloci einer bestimmten Gruppe von tRNA-Isoakzeptoren (z.B. Q-Basen haltige tRNA-Spezies) zu untersuchen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Gene eines möglichst breiten Spektrums verschiedener tRNA-Spezies mittels "in situ" Hybridisierung cytologisch zu lokalisieren. Von besonderem Interesse war dabei die Genanordnung der Q-Basen haltigen tRNA's. Weiter wurde versucht, die gefundenen tRNA-Genloci mit bekannten, entwicklungsbiologisch interessanten Mutationen von Drosophila melanogaster zu korrelieren.

M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

1. Drosophila-Zuchten und Präparation der Speicheldrüsen-chromosomen

Drosophila melanogaster des Wildstammes Oregon R wurde in 20 x 40 x 60 cm Plexiglaskäfigen auf Standardfutter (Mais, Zucker, Agar, Hefe) bei 25°C gezüchtet. Fünftägige Fliegen wurden gesammelt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C aufbewahrt.

Für die Präparation der Speicheldrüsen wurden verpupungsreife Larven der Mutante giant (gt, 1 - 0,9) verwendet. Diese Mutation verlängert die Entwicklungsdauer der Larven und erlaubt so ein bis zwei zusätzliche DNA-Replikationsrunden (Kaufman, 1971). Das erhöht den Polytäniegrad der Speicheldrüsenchromosomen und damit die Effizienz der "in situ" Hybridisierung. Die polytänen Chromosomen wurden nach der Methode von Atherton und Gall (1972) mit den Modifikationen von Spradling et al. (1977) präpariert.

2. Isolation, Fraktionierung und radioaktive Markierung der Nukleinsäuren

2.1. Ribonukleinsäuren

2.1.1. Transfer-RNA Isolation und Vorfraktionierung

Die RNA wurde nach einer Standard-Phenolmethode (Kirby, 1956) aus Stägigen Fliegen extrahiert, in 0,1 x SSC (1 x SSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M Na-Citrat pH 7,0) aufgenommen und mit 4,6 M K-Acetat pH 6,0 auf 3 M K-Acetat gebracht. Bei 0°C wurde die hochmolekulare RNA während dreier Stunden ausgefällt (Kern, 1975). Nach Zentrifugation wurde die niedermolekulare RNA mit 2,5 Volumen Aethanol bei -20°C über Nacht aus dem

Ueberstand ausgefällt. Das Präzipitat wurde in 0,1 M NaCl, 5 mM $MgCl_2$ und 0,1 mM EDTA aufgenommen und die tRNA mittels Sephadex G-100 Gelfiltration von der 5S RNA und Resten hochmolekularer RNA abgetrennt. Die tRNA enthaltende Fraktion wurde mit Aethanol ausgefällt, in bidestilliertem Wasser aufgenommen und bei $-20^{\circ}C$ aufbewahrt.

Die einzelnen tRNA-Spezies wurden in allen Fällen mittels Sepharose 4B Chromatographie vorfraktioniert und anschließend mit isoakzeptor-spezifischen Trennmethode gereinigt (Egg, 1978). Für $tRNA_4^{Glu}$ wurde eine Anticodon-Anticodon Affinitäts-Chromatographie (Grosjean et al., 1973; Altwegg, 1977) und für die Q-Basen haltige $tRNA_{20}^{Asp}$ eine Concanavalin A Chromatographie verwendet (Egg, 1978). Transfer- $tRNA^{His}$ und $tRNA^{Asn}$ wurden mittels DBAE-Cellulose Chromatographie angereichert (McCutchan et al., 1975; Dudler, 1977).

2.1.2. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zur zweidimensionalen Auftrennung der tRNA-Proben wurde das von A. Egg (1978) modifizierte Gelsystem von Blatt und Feldmann (1973) verwendet. Bei vorfraktionierten Proben wurden jeweils 2 - 4 A_{260} -Einheiten RNA in 40 - 50 μl Volumen pro Gelschlitz aufgetragen, während für die gesamte tRNA 10 - 15 A_{260} -Einheiten / 40 - 50 μl gebraucht wurden. Für analytische Zwecke wurden die Gele nach der Elektrophorese mit Stains-all (Serva: 0,005% Stains-all in 50% Formamid) gefärbt und mit Leitungswasser entfärbt. Bei präparativer Auftrennung wurden die Gele für mindestens 2 Stunden mit Ethidiumbromid (EtBr) gefärbt. Färbelösung: EtBr (50 $\mu g/ml$) in 1 x PAGE-Elutionspuffer (0,5 M NH_4 Acetat pH 5,0; 0,01 M MgAcetat; 0,1 mM EDTA; 0,1% SDS). Die aufgetrennten Proben wurden unter UV sichtbar gemacht, ausgestanzt und die kleinen Gel-Zylinder durch eine 1 ml Plastikspritze gepresst. Nach Zugabe von zwei Volumen Elutionspuffer wurde über Nacht bei

37°C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation (Rotor HS4, 7000 rpm, 5 Min.) wurde aus dem Ueberstand die tRNA mittels DEAE-Cellulose Chromatographie konzentriert und zweimal mit Aethanol ausgefällt (Gould und Matthews, 1976). Diese zweimalige Präzipitation war notwendig, um letzte Reste des störenden EtBr zu beseitigen.

Für die Reinigung von 5S RNA wurden dieselben Methoden verwendet. Nach der Sephadex G-100 Gelfiltration wurde das Aethanol fällbare Material der 5S Fraktion mit eindimensionaler PAGE aufgetrennt, die RNA der 5S Bande mit EtBr sichtbar gemacht, eluiert und ebenfalls mittels DEAE-Cellulose Chromatographie konzentriert.

2.1.3. Aminoacylierung

Die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen wurden nach den Angaben von Olexa (1977) präpariert und bei -90°C während maximal 45 Tagen aufbewahrt. Die gereinigten tRNA Proben wurden nach der Methode von White und Tener (1973) mit ^{14}C und ^3H markierten Aminosäuren beladen.

2.1.4. Reversed-phase Chromatographie

Das Isoakzeptorenmuster der gereinigten tRNA Spezies wurde mit RPC-5 Chromatographie ermittelt. Benutzt wurde das von Pearson et al. (1973) entwickelte System. Sämtliche Versuche konnten mit der von Hosbach (1977) beschriebenen Anlage durchgeführt werden, wobei aber eine 0,7 x 46 cm Hochdrucksäule verwendet wurde. Eluiert wurde mit einem 200 ml linearen Salzgradienten (White et al., (1973a) und die Aktivität der einzelnen Fraktionen, nach zufügen von Toluol, Triton X-100, PPD und POPOP (Carter und van Dyke, 1973), in einem Packard Liquid Scintillation Counter gemessen.

2.1.5. Fingerprintanalysen gereinigter tRNA-Fractionen

Die Verdauungsprodukte von ^{125}I -tRNA mit pankreatischer Ribonuklease A wurden mit entsprechenden Standard-Methoden zweidimensional aufgetrennt. 1. Dimension: Cellulose-Acetat, pH 3,5. 2. Dimension: Homochromatographie (Brownlee, 1972).

2.1.6. Iodierung von tRNA mit Na^{125}I

Sämtliche Iodierungsreaktionen wurden ohne jede Modifikation nach der Methode von Prensky (1975) durchgeführt. Na^{125}I stammte von NEN Boston Mass. (Cat. No. NEZ-033L).

Während der Iodierungsreaktion entsteht als Vorstufe des stabilen 5-Iodo-Cytosin ein relativ instabiles Zwischenprodukt (Commerford, 1971; Prensky, 1975). Der Uebergang von der instabilen in die stabile Form wird durch ein 30-minütiges Erhitzen der Probe auf 60°C bei pH 7,5 herbeigeführt und die ^{125}I -tRNA mittels DEAE-Cellulose Chromatographie vom freien ^{125}I getrennt. Zugaben von 1,0 - 1,5 A_{260} -Einheiten kalter, PAA-gereinigter 5S RNA von Drosophila melanogaster als carrier-RNA erhöhen bei diesem Schritt die Ausbeute an ^{125}I -tRNA wesentlich. Bei der Aufbereitung von ^{125}I -5S RNA wurde kalte E.coli tRNA (Boehringer, Mannheim) als carrier-RNA verwendet. Nach zweimaliger Präzipitation mit 2,5 Volumen Aethanol wurde die markierte RNA in bidestilliertem Wasser oder in Hybridisierungspuffer aufgenommen.

Bei der Präparation von ^{125}I -RNA für die Filterhybridisierungen wurde die radioaktive Probe ein zweites Mal erhitzt. Dazu wurde die ^{125}I -RNA in 300 μl TNE (0,05 M Tris-HCl pH 7,5, 0,25 M NaCl, 1 mM EDTA) 0,01 M NaSO_3 aufgenommen, während 30 Minuten auf 70°C gebracht und anschliessend über Sephadex G-25 gereinigt. Dieser zusätzliche Schritt bringt den Anteil der instabilen Form von Iodo-Cytosin auf ein Minimum und verhindert das Freiwerden von störenden ^{125}I -Molekülen während der Hybridisierungsreaktion.

^{125}I -RNA wurde in gelöster Form bei -20°C während

höchstens 30 Tagen aufbewahrt.

2.1.7. Präparation von ^{32}P markierter tRNA aus Zellkulturen

Schneider-3 Zellen wurden nach den Angaben von Matouschek (1979) mit ^{32}P markiert. Die Isolation und Reinigung der ^{32}P markierten tRNA-Spezies erfolgte nach den oben beschriebenen Methoden.

2.2. Desoxyribonukleinsäuren

2.2.1. Isolation der DNA

Bei der Isolation von hochmolekularer DNA aus adulten Drosophila melanogaster ist die hohe Konzentration cytoplasmatischer Nukleasen ein wesentlicher Störfaktor. Muss DNA aus adulten Tieren für eine Restriktionsanalyse extrahiert werden, erfolgt das am besten über eine sorgfältig gereinigte Kernfraktion.

3 - 4 gr Fliegen wurden in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill pulverisiert und in 10 ml /gr Fliegen Homogenisationspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0,35 M Saccharose) in einem Potterhomogenisator von Hand schonend homogenisiert. Nach abfiltrieren der Zelldebris durch Gaze (Polymon, PES 400-37 ASTM) wurden die Kerne während 20 Minuten bei 1000 x g pelletiert und erneut in 6 - 10 ml Homogenisationspuffer aufgenommen. Dieser Vorgang wurde mindestens 2x wiederholt. Darauf wurden die Kerne in 3 ml TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen, das Volumen der Suspension bestimmt und ein gleiches Volumen 2x Lysispuffer zugegeben (1x Lysispuffer = 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM EDTA, 0,15 M NaCl, 2% Sarkosyl). Lysiert wurde während 15 - 20 Minuten bei 65°C. Nach Abkühlen auf Eis wurde zur Deproteinisierung 5 M Na-Perchlorat (0,14ml/ml) beigelegt und das visköse Lysat einmal mit einem gleichen Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) während mindestens 5 Minuten sorg-

fältig ausgeschüttelt. Nach einer kurzen Zentrifugation (Rotor HS4, 7000 rpm, 5 Minuten) wurde die DNA mit einem Volumen Aethanol aus der wässrigen Phase ausgefällt und aufgespult. Das fädige Präzipitat wurde in 6 ml TE aufgenommen und während einer mindestens 24stündigen Dialyse gegen 1 x TE gleichzeitig gelöst. Den letzten Reinigungsschritt bildete eine CsCl-Dichtegradientenzentrifugation (Flamm et al., 1969). Die viskösen Fraktionen wurden zusammengegeben und gegen 3 x 2 Liter TE über Nacht dialysiert. Die Konzentration wurde photospektrometrisch bestimmt ($1 A_{260}$ -Einheit = 50 μ g DNA) und die DNA in 200 μ l Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2. Restriktionsenzymverdauungen

Für die Verdauungen von DNA mit den Restriktionsenzymen Eco RI, Hind III, Bgl I und Bam HI (Bethesda Research Laboratories) wurden die Angaben der Herstellerfirma genauestens eingehalten. Das Ausmass einer Verdauung wurde durch Beigabe von DNA des Phagen λ (1/5 der Menge zellulärer Drosophila-DNA) überprüft. Eine Verdauung galt als abgeschlossen, wenn keine unverdaute Phagen-DNA mehr sichtbar war. Die restringierte DNA wurde mit 2,5 Volumen Aethanol ausgefällt (30 Min. bei -90°C), während 10 Minuten pelletiert (Eppendorf Zentrifuge), getrocknet und in "Loening-Puffer" (36 mM Tris base, 30 mM NaH_2PO_4 , 1 mM EDTA) aufgenommen.

2.2.3. Agarosegelelektrophorese

Für die Auftrennung der DNA-Restriktionsfragmente wurden horizontale Gelplatten (12,0 x 13,0 x 0,8 cm) verwendet, die 0,4 resp. 0,7% Agarose (Litex, AGS 165) in 1 x "Loening-Puffer" enthielten. Zu 5 μ g gelöster DNA wurde ein gleiches Volumen Auftragspuffer (0,2% Agarose, 10 mM Tris-HCl pH 7,8, 20 mM EDTA, 10% Glycerol, 0,01% Bromphenolblau) gegeben, wobei das Endvolumen dem Volumen der Auftragsvertiefung des Gels (0,2 x 0,5 x 0,7 cm) angepasst wurde. Die Elektrophorese dauerte bei 18 V und 35 mA 15 Stunden. Nach Beendigung des

Laufes wurden die Gele mit EtBr gefärbt und unter UV photographiert.

2.2.4. Uebertragung von DNA-Restriktionsfragmenten auf Nitrocellulosefilter

Die Methode für die Uebertragung von DNA-Fragmenten auf Milliporefilter (HAWP 00010) konnte von Southern (1975) mit den Modifikationen von Wahl et al. (1979) übernommen werden. Die Gele wurden den Angaben von Wahl et al. (1979) entsprechend vorbehandelt und darauf, wie bei Southern (1975) beschrieben, denaturiert, neutralisiert und die DNA-Fragmente über Nacht auf Milliporefilter übertragen. Nach dem Transfer wurden die Filter kurz in 2 x SSC gespült, luftgetrocknet und anschließend unter Vakuum während mindestens zwei Stunden bei 80°C gebacken.

3. Hybridisierungen

3.1. "In situ" Hybridisierung ¹²⁵I markierter tRNA an polytäre Speicheldrüsenchromosomen von Drosophila melanogaster

Ein vorrangiges Problem dieser Methode bleibt der variable, oft sehr hohe background über den Chromosomen, der selbst durch intensives Waschen nicht entfernt werden kann. Es besteht die Vermutung, dass markierte tRNA unspezifisch an basische Gruppen lokal konzentrierter, unlöslicher Proteine gebunden werden kann. Durch Acetylierung und damit Blockierung solcher basischer Gruppen kann die Background-Markierung über den Chromosomen drastisch vermindert werden (Hayashi et al., 1978).

Mit den Modifikationen von Szabo et al. (1977) wurden die "in situ" Hybridisierungsreaktionen den Angaben von Pardue und Gall (1975) entsprechend durchgeführt. Endogene RNA wurde mit pankreatischer Ribonuklease A (100 µg/ml) verdaut (60 Minuten bei 37°C). Als letzter Schritt vor der Dena-

turierung der chromosomalen DNA wurde ein Teil der Präparate acetyliert (Hayashi et al., 1978). Dazu wurden jeweils 10 Präparate in 200 ml 0,1 M Triäthanolamin-HCl Puffer pH 8,0 gegeben. 0,5 ml Essigsäureanhydrid wurden beigelegt und unter heftigem Schwenken homogen verteilt. Nach 30minütiger Inkubation bei Zimmertemperatur wurden die Präparate in 2 x SSC gewaschen (15 Min.), 1 x in 75% und 1 x in 96% Äthanol, während je 15 Min. dehydratisiert. In diesem Zustand waren sie für den Denaturierungsschritt in 0,07 N NaOH (2 - 3 Min.) bereit. Die Reaktionsbedingungen der "in situ" Hybridisierung für acetylierte Präparate waren: 2 x SSAE, 50% Formamid, 0,5 mM KI, 40°C (1 x SSAE = 15 mM NaAcetat pH 5,0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA) und für nicht acetylierte Präparate: 2 x SSC pH 7,0, 50% Formamid, 0,5 mM KI, 40°C. Routinemässig wurde dem Reaktionsgemisch PAA gereinigte Drosophila melanogaster SS rRNA und poly(A) als carrier in minimal 300fachem Ueberschuss beigegeben. Die Hybridisierungen wurden, wie in den Legenden beschrieben, mit verschiedenen ¹²⁵I-tRNA-Konzentrationen und Reaktionszeiten durchgeführt. Unspezifische Hybride wurden durch RNase A -Verdauung (20 µg/ml, 60 Minuten bei 37°C) entfernt. Nach kurzer Dehydratisierung mit 96% Äthanol wurden die Präparate luftgetrocknet, mit Kodak NTB 2 Filmemulsion überzogen und während 32 - 55 Tagen exponiert. Nach dem Entwickeln und Fixieren der Filmschicht wurden die Chromosomen mit Giemsa angefärbt (Fluka, CH; Färbelösung 1:20 mit 10 mM Phosphatpuffer pH 6,8 verdünnt).

Die markierten Regionen wurden unter Benützung photographischer und zeichnerischer Darstellungen von Speicheldrüsenchromosomen identifiziert (Ashburner und Novitski, 1976). Für die statistische Auswertung der Resultate der "in situ" Hybridisierungen von tRNA₄^{Glu} und tRNA₂₀^{Asp} wurde ein Thorndike Nomogramm verwendet (Sachs, 1974).

3.2. Hybridisierung von ^{125}I -RNA an DNA-Restriktionsfragmente

Für die Hybridisierungsreaktion wurden die Filter (11,5 x 12,8 cm) zwischen zwei silikonisierte Glasplatten gebracht. Um das Verdunsten von Wasser zu verhindern, wurden die Glasplatten mit einem Fettstreifen abgedichtet und mit zwei Lagen "saran wrap" umwickelt. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches (5ml/Filter) konnte, geringfügig modifiziert, von Stark und Williams (1979) übernommen werden: 50% de-ionisiertes Formamid, 5 x SSC, 0,2% SDS, 300 µg/ml E.coli tRNA (Boehringer, Mannheim), 0,5 mg/ml Ficoll 400 (Pharmacia Fine Chemicals), 0,02% Bovine Serum Albumin (Sigma, No A - 5003; BSA wurde vor Gebrauch für 2 Std. bei 37°C mit 0,05% Diäthylpyrocarbonat behandelt), 1 bis 2 x 10⁶ cpm/ml ^{125}I -RNA. Nach 24stündiger Inkubation bei 41°C wurden die Filter zuerst für 3 x 20 Min. in 50% de-ionisiertem Formamid und 5 x SSC bei 35°C und darauf 2 x 10 Min. in 2 x SSC bei Zimmertemperatur gewaschen. Weiter folgten 30 Min. RNase A - Verdauung (10 µg/ml in 2 x SSC, 37°C), 3 x 10 Min. 2 x SSC und 1 x 5 Min. 0,1 x SSC. Die luftgetrockneten Filter wurden anschliessend auf eine Aluminiumplatte gebracht und mit "saran wrap" abgedeckt. Autoradiographie erfolgte bei -90°C mit einem Kodak X-Omat R Film und Ilford Fast Tungstate Verstärkerplatten (Laskey und Mills, 1977). Exponiert wurde während 14 - 21 Tagen.

R E S U L T A T E

1. Isolation der einzelnen tRNA-Spezies

1.1. Sepharose 4B Chromatographie

Die Auftrennung von Gesamt-tRNA mittels Sepharose 4B Chromatographie ergibt das in Abb. 1a dargestellte, in hohem Masse reproduzierbare Elutionsprofil. Die Verteilung der einzelnen tRNA-Spezies entlang des inversen Ammoniumsulfatgradienten wurde durch Aminoacylierung mit ^{14}C markierten Aminosäuren bestimmt. Aus Abb. 1c geht hervor, dass tRNA^{Asn} und tRNA^{Asp} praktisch nur in Fraktion VII enthalten sind. Da diese Fraktion auch noch einen wesentlichen Teil der tRNA^{His} umfasst, diente sie als Ausgangsmaterial für die weitere Reinigung dieser drei tRNA-Spezies. Abb. 1b gibt das Elutionsprofil der tRNA^{Glu} wieder. Hier konnten die beiden Hauptfraktionen V und VI zur Isolation dieser tRNA-Spezies verwendet werden.

Transfer-RNA^{Met} lässt sich mittels Polyacrylamidgелеlektrophorese allein nur sehr schwer von tRNA^{His} und tRNA^{Ala} trennen. In Abb. 1c wird deutlich, dass sich tRNA^{Met} jedoch durch Vorfraktionierung über Sepharose 4B quantitativ von den restlichen, in dieser Arbeit verwendeten tRNA-Spezies abtrennen lässt und so die Reinderstellung der tRNA^{His} und tRNA^{Ala} wesentlich erleichtert wird.

1.2. Chromatographische Reinigung der tRNA₄^{Glu} und tRNA₂₀^{Asp}

Die Resultate der Hefe tRNA^{Phe} Affinitäts-Chromatographie für die Isolation der tRNA₄^{Glu} sind von Altwegg (1977) im Detail beschrieben worden. Reversed-phase Chromatographie als letzter Reinigungsschritt lieferte eine tRNA-Fraktion, die auf Grund von Fingerprintanalysen, Amino-

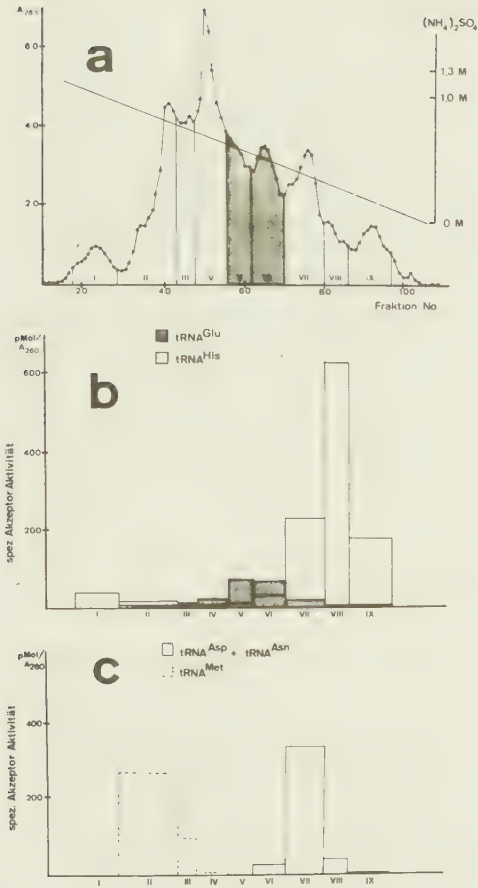


Abb. 1: Sepharose 4B Chromatographie von Drosophila tRNA.

- a) 800 A₂₆₀-Einheiten tRNA wurden in 10 mM NaAcetat pH 4,5, 10 mM MgCl₂, 6 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM EDTA und 1,3 M (NH₄)₂SO₄ bei 4°C auf eine 0,9 x 40 cm Säule aufgetragen. Inverser Gradient: 500 ml 1,3 - 0 M (NH₄)₂SO₄, Flussgeschwindigkeit 40 ml/h.
- b) Aminoacylierungsprofil von tRNA^{Glu} und tRNA^{His}.
- c) Aminoacylierungsprofil von tRNA^{Met}, tRNA^{Asn} und tRNA^{Asp}.

acylierung und zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese als rein angesehen werden kann (Abschnitt 1.4. und 3.).

Mit relativ geringem Aufwand lässt sich die tRNA^{Asp}₂₀ von Drosophila melanogaster rein darstellen, da die seltene Base Q* an der ersten Stelle im Anticodon dieser tRNA (White und Tener, 1973) die Anwendung der eleganten Methode der Concanavalin A Affinitäts-Chromatographie erlaubt (Okada et al., 1977; Egg, 1978). Das tRNA-Gemisch der Sepharose 4B Fraktion VII wurde daher mit einer Concanavalin A Sepharosesäule weiter aufgetrennt. Das Elutionsprofil zeigte nach einem Pufferwechsel einen gut definierbaren Peak, der mit 900 pMol Asparaginsäure pro A₂₆₀-Einheit tRNA beladen werden konnte. Die Ergebnisse der Polyacrylamidgelelektrophorese lassen auch hier vermuten, dass es sich um eine reine Fraktion der tRNA^{Asp}₂₀ handelt (Abschn. 1.4.).

1.3. DBAE-Cellulose Chromatographie

Aminoacylierungsversuche haben gezeigt, dass die Sepharose 4B Fraktion VII vor allem tRNA-Spezies der Aminosäuren Ala, Arg, Asn, Asp, Val, Pro, His und in geringerem Masse Ser, Trp und Cys enthält. Die meisten dieser tRNA's lassen sich elektrophoretisch gut trennen. Zwei Ausnahmen machten es aber notwendig, für die Isolation der tRNA^{Asn} und der tRNA^{His} einen weiteren Fraktionierungsschritt einzusetzen. Transfer-RNA^{Pro} und tRNA^{Asn} migrieren im 2-D PAGE System als ein Fleck (Dudler et al., 1980). Transfer-RNA^{His} und tRNA^{Ala} erscheinen als Doppelfleck und sind in präparativen Gelen oft schwer auseinanderzuhalten (Abb. 3b). Mittels DBAE-Cellulose Chromatographie können tRNA^{Pro} und tRNA^{Asn} jedoch vollständig getrennt werden. Transfer-RNA^{His} lässt sich mit dieser Methode lediglich anreichern, doch die erhöhte Konzentration gegenüber der tRNA^{Ala}-Fraktion macht

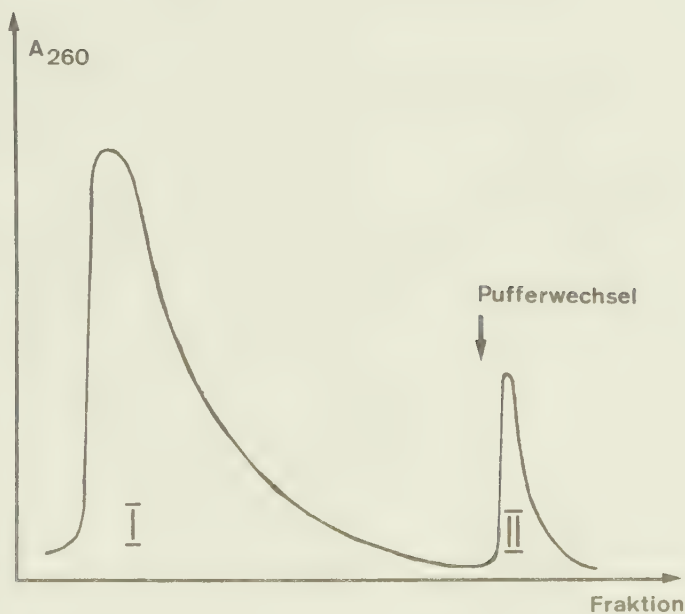


Abb. 2: DBAE-Cellulose Chromatographie.

150 A_{260} -Einheiten tRNA wurden in 1 ml Puffer E (1 M NaCl, 0,01 M $MgCl_2$, 0,05 M Methyl-Morpholin pH 8,7, 20% Aethanol) auf eine 1,6 x 11 cm Säule aufgetragen. Mit demselben Puffer wurde gespült, bis der A_{260} -Messwert auf das Ausgangsniveau gesunken war. Die Elution der Fraktion II erfolgte mit Puffer C (0,2 M NaCl, 0,05 M NaAcetat pH 5,0). Unter diesen Bedingungen werden $tRNA^{Asn}$ und $tRNA^{His}$ erst bei tiefem pH eluiert und erscheinen zur Hauptsache in Fraktion II, während $tRNA^{Pro}$ quantitativ und $tRNA^{Ala}$ teilweise schon bei hohem pH und 20% Aethanol eluiert werden.

eine eindeutige Trennung erst möglich. Abb.2 zeigt das Elutionsprofil einer DBAE-Cellulose Chromatographie.

1.4. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE)

Zur weiteren Reinigung der tRNA^{His} und tRNA^{Asn} wurde die DBAE-Cellulose Fraktion II in einem präparativen 2-D PAGE System aufgetrennt (Abb. 3b). Die RNA der einzelnen Flecken wurde eluiert und durch Aminoacylierung die tRNA-Spezies bestimmt (Tabelle 1). Die Ergebnisse zeigen deut-

Tabelle 1

Spezifische Akzeptor Aktivität der tRNA von 2-D PAGE Fraktionen.

Frak. No aus präparativen Gelen	¹⁴ C Amino- säure	Akzeptor- aktivität pM/A ₂₆₀	tRNA Spezies
1	Pro	0	Asn
	Asn	1160	
	Asp	0	
1a	Pro	0	Asn
	Asn	1113	
	Asp	0	
2	His	792	His
	Asp	0	
	Ala	0	
2a	His	290	His+Ala
	Asp	0	
	Ala	670	
3	His	0	Arg
	Arg	1408	
4	Asp	0	Val
	Val	906	
	Arg	0	
5	Asp	857	Asp
	Asn	0	

lich, dass das DBAE-Cellulose System zur Reindarstellung der Q-Basen haltigen tRNA's nicht ausreicht. Fraktion II enthält neben einigen schwächeren Flecken immer fünf Hauptfraktionen. In allen Fällen werden neben tRNA^{Asn} und tRNA^{His} Isoakzeptoren der Aminosäuren Ala, Val und Arg co-chromatographiert.

In Abb. 3a wird das Trennvermögen der 2-D PAGE demonstriert. Nicht fraktionierte tRNA lässt sich mit hoher Reproduzierbarkeit in rund 60 eindeutig ansprechbare Flecken auftrennen. Das entspricht den 40 - 60 Hauptisoakzeptoren, die für Drosophila melanogaster erwartet werden dürfen (Grigliatti et al., 1974). Bei tRNA's, die mit diesem System in keine weiteren Fraktionen mehr aufgetrennt werden, handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um homogene Proben. Die 2-D PAGE wurde deshalb zur Kontrolle des Reinheitsgrades einer tRNA-Fraktion eingesetzt.

Iodierte Proben der tRNA₄^{Glu} und tRNA₂₀^{Asp} wurden auf analytischen Gelen untersucht. Während sich tRNA₂₀^{Asp} als homogene tRNA-Fraktion erwies (Abb. 3c), resultierte die Elektrophorese der tRNA₄^{Glu} in zwei Flecken von unterschiedlicher Stärke (Abb. 3d). Da Fingerprintanalysen beider Fraktionen aber identische Ergebnisse lieferten, handelte es sich möglicherweise um einen Effekt der Iodierungsreaktion (Batey und Brown, 1977). Eine minimale Verunreinigung durch einen tRNA^{Glu}-Isoakzeptor mit demselben Anticodon und sehr ähnlicher Sequenz ist allerdings nicht auszuschliessen.

In keinem einzigen Fall erreichten die Aminoacylierungsdaten den theoretischen Wert von 1600 pMol/A₂₆₀-Einheit für eine 100% reine tRNA (Tabelle 2). Diese niedrigen Beladungswerte der 2-D PAGE gereinigten tRNA-Fractionen lassen sich mit der extremen Instabilität der Drosophila Aminoacyl-tRNA-Synthetasen erklären.

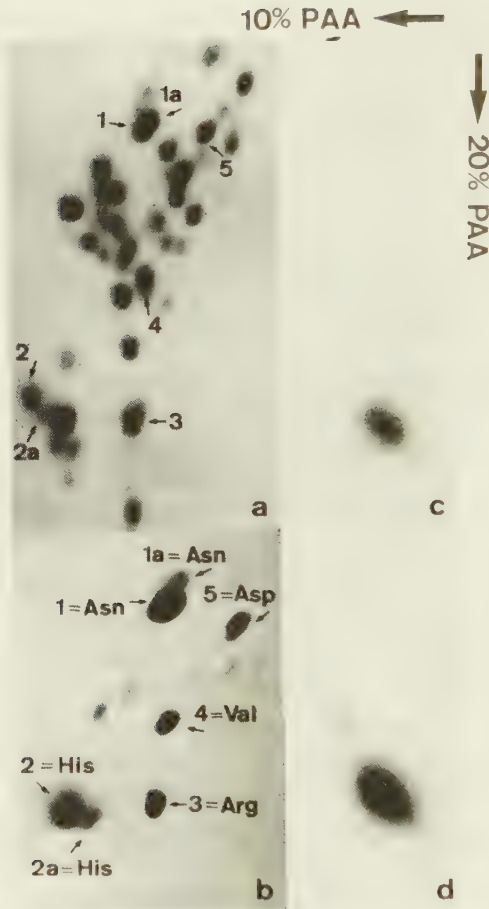


Abb. 3: Zweidimensionale Elektrophorese (2-D PAGE).

a) Kalte, unfraktionierte Drosophila melanogaster tRNA, Stains-all gefärbt. b) Unmarkierte Sepharose 4B Fraktion VII, Stains-all gefärbt. c) ^{125}I -tRNA $_{20}^{\text{Asp}}$. d) ^{125}I -tRNA $_{4}^{\text{Glu}}$.

Tabelle 2

Aminoacylierungsergebnisse

tRNA Spezies	Trennmethode	pMol/A ₂₆₀
Glu	Sepharose 4B- + Affinitäts- + RPC-5 Chromatographie	550
Asp	Sepharose 4B-+ Concanavalin A- Affinitäts-Chromatographie	906
Asp	Sepharose 4B + 2-D PAGE	857
Asn	Sepharose 4B + 2-D PAGE	1150
His	Sepharose 4B + 2-D PAGE	790
Ala	Sepharose 4B + 2-D PAGE	670
Val	Sepharose 4B + 2-D PAGE	910
Arg	Sepharose 4B + 2-D PAGE	1410

2. Identifikation der einzelnen Isoakzeptoren

Für die Zuordnung der isolierten tRNA's zu bestimmten Isoakzeptoren wurden die gereinigten tRNA-Proben mit ¹⁴C markierten Aminosäuren beladen und mit unfraktionierter ³H -Aminoacyl-tRNA über RPC-5 co-chromatographiert (Abb. 4 und 5). In einer zweiten Serie von Versuchen wurden ³²P uniform markierte, gereinigte tRNA-Spezies gemeinsam mit ³H-Aminoacyl-tRNA über RPC-5 aufgetrennt (Abb. 6). Da bei einer reinen tRNA-Probe ein einziger RPC-5 Peak erwartet werden darf, dienten diese Doppelmarkierungsexperimente als zusätzliches Reinheitskriterium.

2.1. Transfer-RNA^{Glu}₄

Transfer-RNA^{Glu}₄ kann nach CNBr-Behandlung nicht mehr beladen werden, was auf ein 2-thio-Uridin im Anticodon dieses Isoakzeptors hinweist (White, 1975). Der mittels Hefe tRNA^{Phe} Affinitäts-Chromatographie (Anticodon: G^mAA) isolierte tRNA^{Glu}₄-Isoakzeptor wurde von Altwegg und Kubli (1980) sequenziert. Er zeigt an der ersten Stelle im Anticodon eine Schwefelmodifikation von U (2-thio-Uridin) und wird im RPC-5 System in einem Doppelmarkierungsexperiment in denselben Fraktionen wie ³H-tRNA^{Glu}₄ (White, 1975) eluiert.

2.2. Transfer-RNA^{Asp}_{2δ}

Abb. 4 zeigt das RPC-5 Profil des mittels Concanavalin A Sepharose isolierten Isoakzeptors. Die ¹⁴C markierte tRNA^{Asp} eluiert mit dem ersten Hauptisoakzeptor, der gemäss White und Tener (1973) der tRNA mit der Modifikation Q* im Anticodon entspricht.

2.3. Transfer-RNA^{Asn}_{5γ}, tRNA^{His} und tRNA^{Ala}

Abb. 5a und 5b stellen die Resultate der Doppelmarkierungsexperimente dar, die mit ¹⁴C-Histidin beladener tRNA aus 2-D PAGE Fraktion 2 resp. 2a (Abb. 3b) und ³H-Histidyl-tRNA durchgeführt wurden. Daraus geht hervor, dass Fraktion 2 beide Isoakzeptoren, Fraktion 2a dagegen im wesentlichen nur die Q-Basen haltige tRNA^{His} enthalten. Wird ¹⁴C markierte tRNA^{Ala} mit ³H-Alanyl-tRNA co-chromatographiert, zeigt sich, dass Fraktion 2a zusätzlich zu den tRNA^{His}-Isoakzeptoren noch sämtliche tRNA^{Ala}-Spezies enthält (Abb. 5c).

Da mit Experimenten dieser Art nur diejenigen tRNA's erfasst werden, die sich "in vitro" aminoacylieren lassen und evtl. kontaminierende Spezies so nicht sichtbar werden,

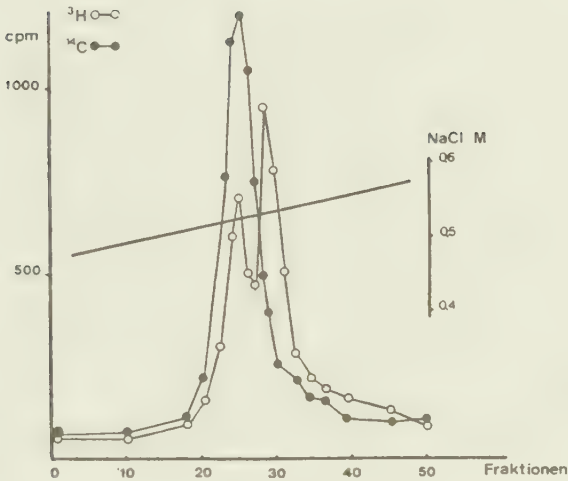


Abb. 4: Reversed-phase Chromatographie Profil von tRNA^{Asp}. *Drosophila* tRNA wurde mit ³H-Asparaginsäure beladen und mit ¹⁴C-Asp markierter, gereinigter tRNA^{Asp}₂₀ co-chromatographiert.

wurden die Versuche mit ³²P markierter tRNA aus Zellkulturen wiederholt. Da beladene und unbeladene tRNA-Moleküle unterschiedlich eluiert werden können, wurden alle Phosphat markierten Fraktionen mit den entsprechenden kalten Aminosäuren acyliert.

Reversed-phase Chromatographie Profile von ³²P markierter tRNA aus Zellkulturen unterscheiden sich in zwei wesentlichen Punkten von Elutionsprofilen, die mit aminoacylierter tRNA aus adulten Fliegen erhalten werden. Transfer-RNA aus Zellkulturen weisen im Fall von tRNA^{Asn} und tRNA^{His} praktisch keine Q-Basen haltige Isoakzeptoren auf. Eine Erklärung dieses Phänomens kann allerdings nicht gegeben werden. Weiter enthalten sie immer prominente tRNA-Fraktionen

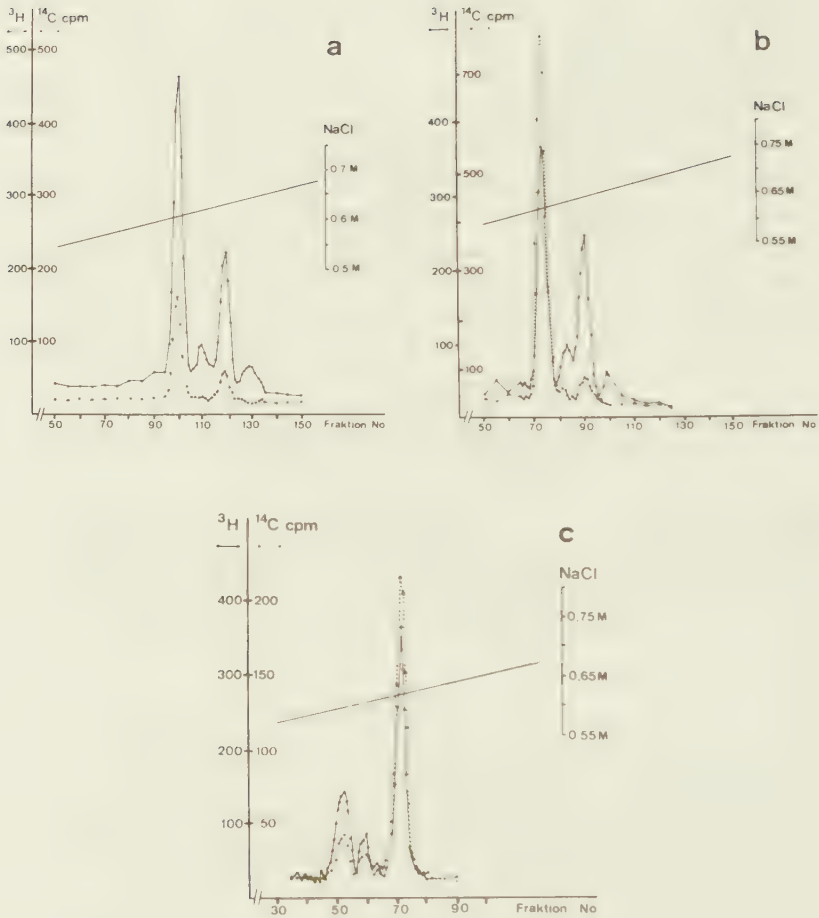


Abb. 9: Co-chromatographie von ^3H markierter *Drosophila* tRNA und gereinigter, ^{14}C markierter tRNA der 2-D PAGE Fraktionen 2 = tRNA^{His} (a) und 2a = $\text{tRNA}^{\text{His}} + \text{tRNA}^{\text{Ala}}$ (b und c).

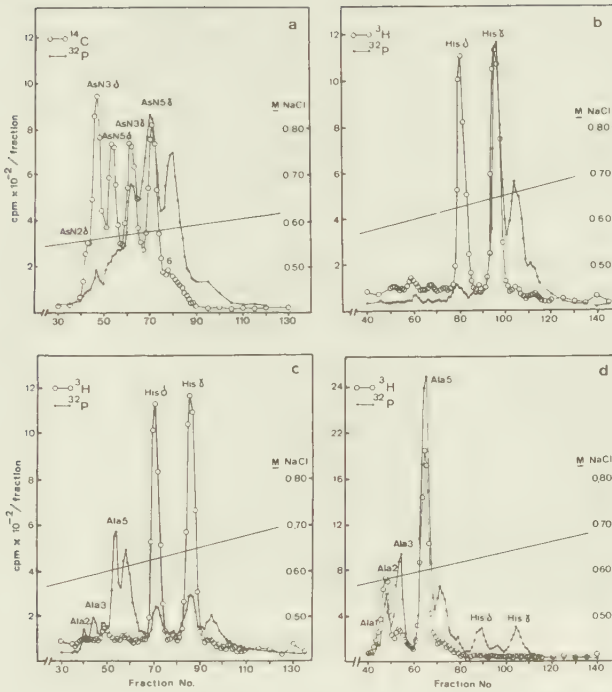


Abb. 6: RPC-5 Chromatographie.

Drosophila tRNA wurde mit ^{14}C Aminosäuren beladen und mit ^{32}P -tRNA der 2-D PAGE Fraktionen 1, 2 und 2a co-chromatographiert. a) Die gereinigte tRNA aus Fraktion 1 entspricht neben der $\text{tRNA}_{3\gamma}^{\text{Asn}}$ zur Hauptsache dem Isoakzeptor $\text{tRNA}_{5\gamma}^{\text{Asn}}$. b) Die gereinigte Fraktion 2 enthält $\text{tRNA}_{\gamma}^{\text{His}}$ und Spuren der $\text{tRNA}_{\delta}^{\text{His}}$. c) Transfer-RNA aus Fraktion 2a co-migriert mit den beiden tRNA^{His} -Hauptfraktionen, enthält aber zusätzlich die Isoakzeptoren der tRNA^{Ala} . d) Bestätigung des Versuches dargestellt in 6c. Transfer-RNA aus Fraktion 2a wird ebenfalls mit den Isoakzeptoren der ^3H -tRNA^{Ala} eluiert.

die unmittelbar nach den entsprechenden Hauptfraktionen eluiert werden, sich aber "in vitro" schlecht beladen lassen und deshalb im ^{14}C -Profil kaum in Erscheinung treten. Es muss aber betont werden, dass alle gereinigten, ^{32}P markierten tRNA-Proben aus Zellkulturen mit den Fraktionen der aminoacylierten tRNA^{Asn}, tRNA^{His} und tRNA^{Ala} übereinstimmen.

Abb. 6 a - d zeigen RPC-5 Profile der tRNA's aus den 2-D PAGE Fraktionen 1, 2 und 2a (Abb. 3b). Während die Fraktionen 1 und 2 im wesentlichen nur einen Isoakzeptor, tRNA^{Asn}₅₇ resp. tRNA^{His} enthalten, sind in 2a beide Spezies, δ und γ , der tRNA^{His} und sämtliche Isoakzeptoren der tRNA^{Ala} zu finden.

3. Fingerprintanalysen

Die Produkte von Verdauungen mit pankreatischer Ribonuklease A der ^{125}I markierten, gereinigten tRNA-Fraktionen wurden, wie in 2.1.5. beschrieben, zweidimensional aufgetrennt und als zusätzliches Reinheitskriterium verwendet.

Die in Abb. 7 a - d gezeigten Verdauungsmuster der iodierten Proben ergeben wenige (9 - 11) markierte Flecken. Da durch die Iodierungsreaktion nur Cytosin markiert wird, entspricht diese geringe Zahl den Erwartungen einer reinen tRNA-Probe. Fraktion 2a enthält im Vergleich zur Fraktion 2 sechs zusätzliche Flecken. Dieses Resultat ist zu erwarten, da es sich hier um tRNA^{His} und tRNA^{Ala} handelt.

4. Iodierung und "in situ" Hybridisierung

Die "in vitro" Iodierung von RNA nach der Methode von Prensky (1975) erwies sich als gut reproduzierbare Reaktion. Die spezifische Aktivität aller untersuchten tRNA-Spezies lag nach der Iodierung zwischen 2 und 4×10^8 dpm/ μg RNA. Das entspricht etwa 1 - 2 Iodmolekülen pro Molekül tRNA.

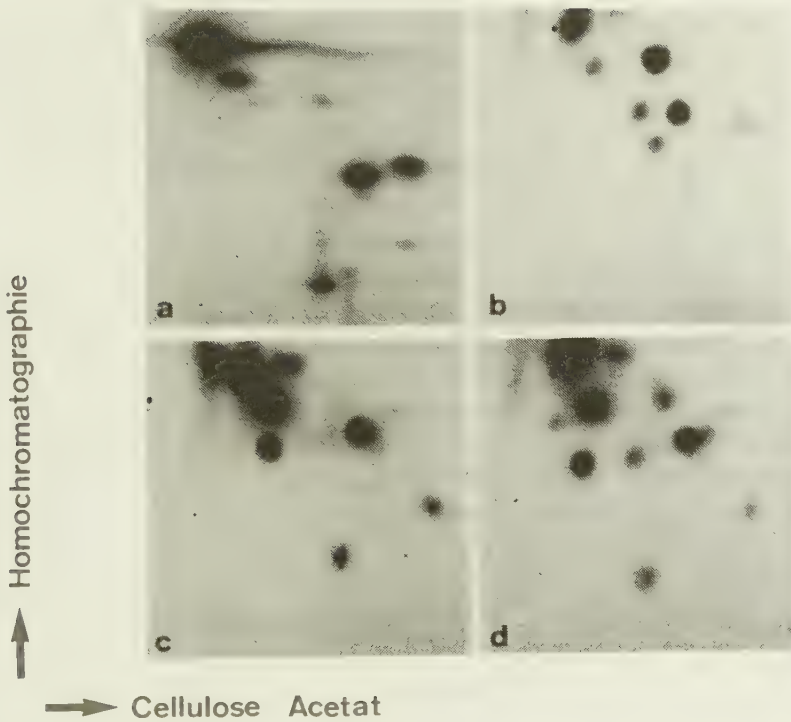


Abb. 7: Pankreatische Fingerprints iodierter tRNA-Proben.

- a) Transfer-RNA^{Glu}₄. b) 2-D PAGE Fraktion 1 (=tRNA^{Asn}_{5Y}). c) 2-D PAGE Fraktion 2 (=tRNA^{His}). d) 2-D PAGE Fraktion 2a (=tRNA^{His} und tRNA^{Ala}).

Selbst minimale Verunreinigungen der iodierten Probe können bei "in situ" Hybridisierungsreaktionen die Interpretation der Ergebnisse erschweren. Grigliatti et al. (1974) fanden bei der "in situ" Hybridisierung von tRNA^{Lys}₅ starke Markierung des 5S RNA Lokus (56EF), die durch Addition von kalter 5S RNA wesentlich reduziert werden konnte. Szabo et al. (1977) weisen darauf hin, dass nicht nur kontaminierende

5S RNA sondern auch Spuren undefinierter tRNA-Spezies, deren Gene in hoher Redundanz vorliegen, Artefakte hervorrufen. Es ist daher notwendig, die "in situ" Hybridisierung mit möglichst niedrigen ^{125}I -tRNA Konzentrationen (= niedrige R_0 -Werte) durchzuführen, um fehlerhafte Interpretationen der Resultate zu vermeiden (Elder et al., 1980).

4.1. Transfer-RNA $_{\text{Glu}_4}$

Iodierte tRNA $_{\text{Glu}_4}$ markiert die Regionen 52F und 56EF auf dem rechten Arm des zweiten und 62A auf dem linken Arm des dritten Chromosoms (Abb. 8). Da der 5S RNA Locus 56EF Markierung zeigte, wurden die Versuche mit einem 300fachen Ueberschuss an kalter 5S RNA wiederholt. In Tabelle 3 werden die Versuche miteinander verglichen.

Tabelle 3

Zahl der Silberkörner über den Regionen der tRNA $_{\text{Glu}_4}$ -Gene

RNA	Silberkörner über den Regionen		
	52F	56EF	62A
tRNA $_{\text{Glu}_4}$ ohne kalte 5S RNA	4,2 $\pm$ 1,7	4,8 $\pm$ 1,2	6,0 $\pm$ 1,3
tRNA $_{\text{Glu}_4}$ mit kalter 5S RNA	6,1 $\pm$ 1,6	10,4 $\pm$ 4,5	5,7 $\pm$ 2,0

Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Markierung über 56EF nicht auf kontaminierende ^{125}I -5S RNA zurückzuführen ist. Tatsächlich scheint die Effizienz der Hybridisierung erhöht zu sein. Dies lässt sich mit einer reduzierten RNase Wirkung auf die ^{125}I -tRNA $_{\text{Glu}_4}$, hervorgerufen durch

den grossen Ueberschuss an kalter 5S RNA, erklären. Die Markierungen über allen drei Loci sind mit $p < 0,001$ statistisch signifikant (Methoden, Abschnitt 3.1.).

4.2. Transfer-RNA^{Asp}₂₀

Transfer-RNA^{Asp}₂₀ zeigt in den Regionen 29D und 29E auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms starke Markierung (Abb. 9). Die Zahl der Silberkörner wurde anhand verschiedener Chromosomen und Präparate mit $4,2 \pm 1,8$ für die Region 29D und mit $6,5 \pm 3,7$ für die Region 29E bestimmt. In einigen Fällen zeigte sich auf denselben Chromosomen eine schwache Markierung bei 25D. Obschon dieser Locus von Hayashi et al. (1980) ebenfalls gefunden wurde, kann nicht mit Sicherheit entschieden werden, ob 25D tRNA^{Asp}₂₀-Gene mit niedriger Redundanz enthält oder ob es sich hier um unspezifische Markierung handelt. Statistisch gesichert ($p < 0,001$) sind nur die Markierungen über den Loci 29D und 29E.

4.3. Transfer-RNA^{Asn}₅₇, tRNA^{His} und tRNA^{Ala}

Auf den Abbildungen 10 und 11 sind polytäre Chromosomen nach der Hybridisierungsreaktion mit tRNA^{Asn}₅₇, tRNA^{His} und tRNA^{Ala} dargestellt. In allen Versuchen wurden zwei bis mehrere chromosomale Loci eindeutig markiert und identifiziert. Transfer-RNA^{Asn}₅₇ hybridisiert an die Stellen 42A, 59F, 60C und 84F (Abb. 10), während tRNA^{His}_{0+γ} der 2-D PAGE Fraktion 2 die Regionen 48F und 56E (Abb. 11) markiert. Wie im Falle von tRNA^{Glu}₄ ist auch hier die Markierung über 56E trotz hohem Ueberschuss an kalter 5S RNA signifikant. Zweidimensionale PAGE Fraktion 2a, welche tRNA^{His} und tRNA^{Ala} enthält, hybridisiert an die cytologischen Regionen 48F, 56E, 63A und 90C (Abb. 11). Die beiden letzteren enthalten mit Sicherheit komplementäre Sequenzen von tRNA^{Ala}-Isoakzeptoren, doch kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei 48F und 56E ebenfalls

transfer-RNA^{Ala}-Gene vorliegen. Alle hier erwähnten Loci werden über einen weiten Bereich von R_{ot} -Werten markiert (Tabelle 4). Bei sehr hohen tRNA-Konzentrationen ($R_{\text{ot}} > 15 \times 10^{-3} \text{ Mol} \times \text{sec./ l}$) erscheint zusätzliche Markierung an weiteren Stellen des *Drosophila*-Genoms. So hybridisiert tRNA der 2-D PAGE Fraktion 2a zusätzlich an 54A, 638C und 66B und tRNA der 2-D PAGE Fraktion 1 an 22B und 54E. Hier könnte es sich um Gene von tRNA-Spezies handeln, die als minimale Verunreinigung mithybridisiert werden oder um Isoakzeptoren der tRNA^{Ala} resp. tRNA^{Asn}, die nur in sehr geringer Konzentration vorhanden sind (z.B. tRNA^{Ala}_{1,2 od.3}). Als dritte Möglichkeit kann Kreuzhybridisierung an Genorte anderer tRNA's mit ähnlicher Sequenz nicht ausgeschlossen werden (Hovemann et al., 1980).

Die Reinheit der in dieser Arbeit verwendeten tRNA-Proben und die restriktiven Bedingungen der "in situ" Hybridisierung lassen den Schluss zu, dass die Hauptregionen der tRNA^{Glu}₄-Gene bei 52F, 56EF und 62A, der tRNA^{Asn}₅₇-Gene bei 42A, 59F, 60C und 84F, der tRNA^{Asp}₂₀-Gene bei 29D und 29E, der tRNA^{His}-Gene bei 48F und 56E und der tRNA^{Ala}-Gene bei 63A und 90C liegen.

Zahl der Silberkörner über den markierten Regionen. Die einzelnen tRNA-Spezies wurden mit steigenden R_0 -Werten ($\times 10^{-3}$ Mol $\times$ sec./l) hybridisiert. Die Zahl der untersuchten Chromosomen ist in Klammern angegeben.

markierte Region	R_0	0,6	1,3	5,1	10,0	15,0	30,0
tRNA ^{Asn} =frak.1							
42A		8,3 $\pm$ 2,9(6)	8,9 $\pm$ 2,9(21)	9,3 $\pm$ 2,2(8)	9,4 $\pm$ 1,8(7)	12,6 $\pm$ 2,8(16)	
59F		1,7 $\pm$ 1,0(18)	2,0 $\pm$ 1,2(28)	3,0 $\pm$ 1,7(11)	6,1 $\pm$ 1,6(7)	4,2 $\pm$ 2,1(16)	
60C		2,3 $\pm$ 1,5(19)	3,0 $\pm$ 1,7(30)	3,3 $\pm$ 1,8(11)	4,9 $\pm$ 1,8(8)	5,1 $\pm$ 0,9(20)	
84F		1,8 $\pm$ 2,2(8)	0,9 $\pm$ 1,4(21)	5,0 $\pm$ 0,9(6)	5,4 $\pm$ 2,8(7)	6,1 $\pm$ 2,0(20)	
tRNA ^{His} =frak.2							
48F		5,4 $\pm$ 2,2(10)	7,6 $\pm$ 2,0(19)	9,1 $\pm$ 2,5(14)	8,9 $\pm$ 1,8(12)	14,8 $\pm$ 2,4(28)	19,5 $\pm$ 4,8(15)
56E		3,0 $\pm$ 0,9(17)	6,0 $\pm$ 2,8(18)	6,4 $\pm$ 3,0(11)	8,9 $\pm$ 1,9(11)	12,8 $\pm$ 2,7(27)	17,4 $\pm$ 5,6(11)
tRNA ^{His} und tRNA ^{Ala} =frak.2a							
48F		2,3 $\pm$ 1,4(20)	3,6 $\pm$ 1,6(25)	6,4 $\pm$ 1,9(24)	8,4 $\pm$ 2,1(19)	13,8 $\pm$ 2,9(20)	15,6 $\pm$ 2,9(12)
56E		1,3 $\pm$ 1,1(21)	1,5 $\pm$ 0,7(22)	4,8 $\pm$ 2,1(21)	6,6 $\pm$ 1,9(14)	14,2 $\pm$ 3,5(19)	19,2 $\pm$ 3,0(13)
63A		0,4 $\pm$ 0,6(16)	0,5 $\pm$ 0,8(20)	1,5 $\pm$ 1,1(19)	2,2 $\pm$ 0,8(10)	8,7 $\pm$ 2,4(13)	10,7 $\pm$ 2,4(10)
90C		0,9 $\pm$ 0,9(14)	1,0 $\pm$ 1,2(16)	1,9 $\pm$ 1,3(10)	7,0 $\pm$ 1,6(8)	16,8 $\pm$ 4,2(18)	15,4 $\pm$ 4,0(9)

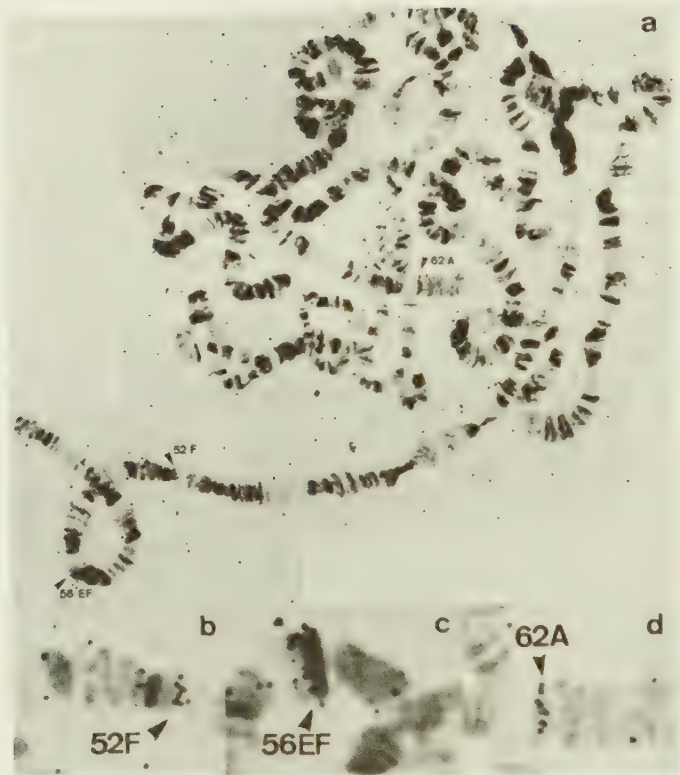


Abb. 8: "In situ" Hybridisierung von ^{125}I -tRNA $_{\text{Glu}}^4$ an polytäre Chromosomen aus Speicheldrüsen der Drosophila Mutante giant.

Markiert sind die Regionen 52F, 56EF und 62A (a). In Abb. 8 b - d sind die Regionen 52F, 56EF und 62A vergrößert dargestellt.

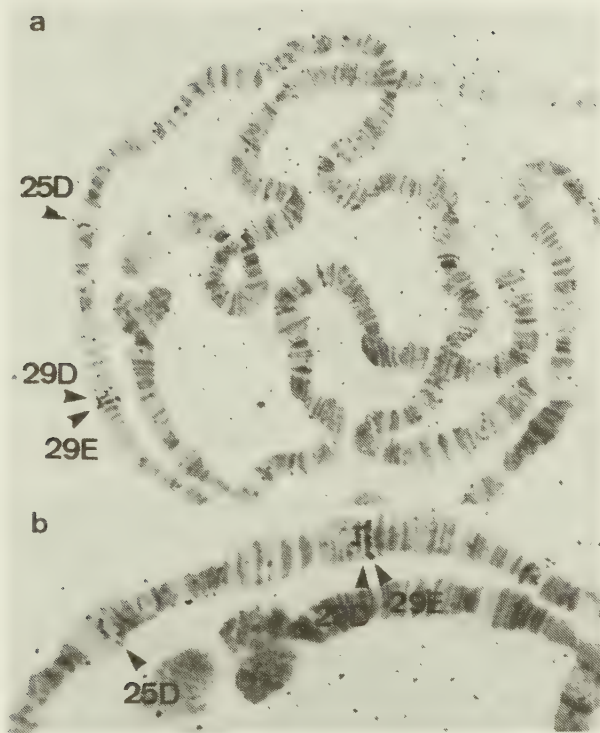


Abb. 9: Hybridisierung von ^{125}I -tRNA $_{20}^{\text{Asp}}$ an Speicheldrüsenchromosomen der Drosophila Mutante giant.

a) Silberkörner finden sich über den Regionen 29D, 29E und 25D. b) Die Regionen 29D, 29E und 25D vergrößert.

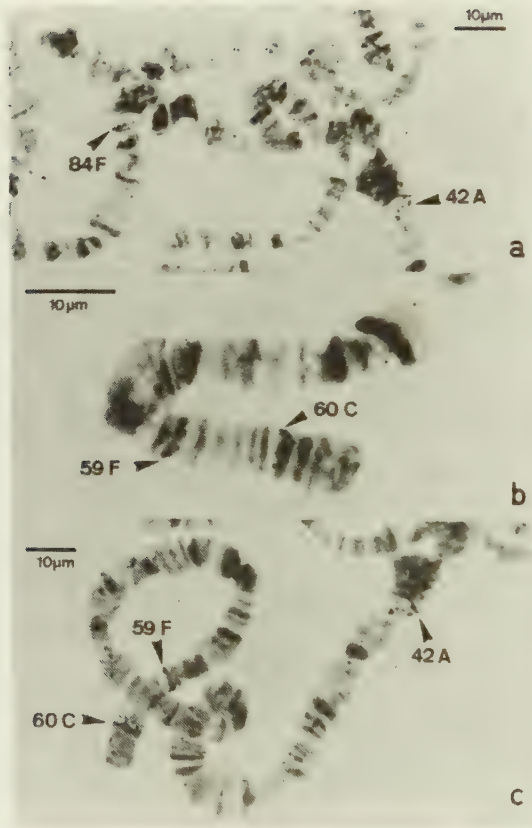


Abb. 10: Hybridisierung von ^{125}I -tRNA $_{57}^{\text{Asn}}$ an polytäre Chromosomen aus Speicheldrüsen der Drosophila Mutante giant.

Die Regionen 42A und 84F (a), sowie 59F (b) und 60C (c) zeigen deutliche Markierung. In allen Fällen sind die Chromosomenpräparate vor der Hybridisierungsreaktion ($R_{\text{ot}} = 1,3 \times 10^{-3} \text{ Mol} \times \text{sec.} / \text{l}$), acetyliert worden.

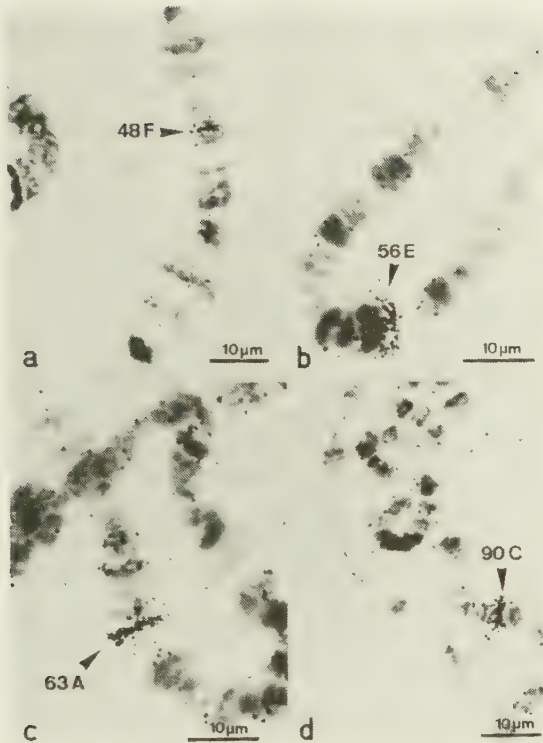


Abb. 11: a+b) Hybridisierung von ^{125}I -tRNA^{His} an acetylierte Präparate von Speicheldrüsenchromosomen der Drosophila Mutante giant.
a) Markierte Region 48F; $R_{\text{ot}} = 15 \times 10^{-3}$ Mol $\times$ sec. / l. b) Markierte Region 56E; $R_{\text{ot}} = 30 \times 10^{-3}$ Mol $\times$ sec. / l.
c+d) Hybridisierung von ^{125}I -tRNA^{His} und ^{125}I -tRNA^{Ala} unter denselben Bedingungen wie in Abb 11 a+b. Zusätzlich zu den Regionen 48F und 56E werden 63A (c) und 90C (d) markiert.

5. Analyse von tRNA spezifischen Genom-DNA Restriktions- fragmenten

Genloci der beiden tRNA's für die Aminosäuren Histidin und Glutaminsäure konnten durch "in situ" Hybridisierung bei 56EF der 5S RNA Region (Wimber und Steffensen, 1970) gefunden werden. Konkurrenzexperimente mit kalter 5S RNA haben in beiden Fällen gezeigt, dass sich diese Markierung nicht mit Hybridisierung von kontaminierender ^{125}I -5S RNA erklären lässt.

Von Prokaryonten weiss man, dass Gene einiger tRNA-Spezies innerhalb rRNA-Genclustern gefunden werden (Lund et al., 1976) und dass 5S RNA- und einzelne tRNA-Sequenzen in einem gemeinsamen 11S Vorläufermolekül enthalten sein können (Ray und Apirion, 1980). Ob im Fall von Drosophila melanogaster zwischen 5S RNA-Genen tRNA-Gene in der gleichen Region des Genoms vorliegen oder ob sich hier ein tRNA-Gencluster lediglich in unmittelbarer Nachbarschaft der 5S RNA-Region befindet, lässt sich mittels "in situ" Hybridisierung nicht entscheiden, da das Auflösungsvermögen der anschliessenden Autoradiographie um Grössenordnungen zu gering ist.

Die rund 160 5S RNA-Gene von Drosophila melanogaster (Tartof und Perry, 1970) liegen in einem einzigen, zusammenhängenden Gencluster in der Region 56EF. Bei einer repetitiven Gen-Einheit von 370 Basenpaaren (Artavanis-Tsakonas et al., 1977; Hershey et al., 1977) muss für den kontinuierlichen Gencluster ein DNA-Abschnitt von >60 kb angenommen werden. Ein 5S RNA spezifisches DNA-Restriktionsfragment von dieser Länge konnte von Artavanis-Tsakonas et al. (1977) und Procunier und Dunn (1978) nachgewiesen werden. Die Autoren verdauten Drosophila Genom-DNA mit den Restriktionsenzymen Eco RI, Bam HI, Bgl II und Hind III, separierten die resultierenden Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese und identifizierten sie nach dem Transfer auf Nitrocellulose-

filter (Southern, 1975) durch Hybridisierung. In allen Fällen wurden 60 - 90 kb lange, 5S RNA spezifische DNA-Fragmente nachgewiesen. Enthält der 5S RNA-Gencluster eingeschobene tRNA-Sequenzen, müssten tRNA spezifische DNA-Fragmente von derselben Länge durch Hybridisierung von ^{125}I -tRNA-Proben aufgezeigt werden können.

Mit der oben beschriebenen Versuchsanordnung können gleichzeitig Aussagen über die Anzahl der Gene einzelner Isoakzeptoren gemacht werden, wenn angenommen wird, dass tRNA-Gene keine Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen enthalten und dass die flankierenden DNA-Abschnitte genügend Variabilität aufweisen, um tRNA spezifische Verdauungsfragmente von unterschiedlicher Länge zu liefern (Olson et al., 1977). Auf weitere Möglichkeiten von Fehlinterpretationen solcher Versuche soll in der Diskussion eingegangen werden.

Abbildung 12 a - c fasst die Ergebnisse der Restriktionsverdauungsexperimente zusammen. 5S DNA enthaltende Restriktionsfragmente von Eco RI-, Bam HI- und Bgl II-Verdauungen sind alle grösser als 49 kb (Abb. 12a), was die Resultate von Artavanis-Tsakonas et al. (1977) bestätigt. Dagegen können in keinem Fall tRNA^{His} oder tRNA₄^{Glu} spezifische Fragmente von ähnlicher Länge nachgewiesen werden. Transfer-RNA₄^{Glu}-Sequenzen enthaltende, 22 - 30 kb lange Eco RI und Bam HI Fragmente (Abb. 12b) sowie ein tRNA^{His} spezifisches Eco RI Fragment von >22 kb (Abb. 12c) sind die längsten, tRNA-Sequenzen enthaltenden DNA-Abschnitte. Da mit dieser Methode auch einzelne Gene erfasst werden können (Olson et al., 1977), ist es unwahrscheinlich, dass im 60 - 90 kb 5S RNA-Fragment tRNA-Gene vorliegen.

Abbildung 12b zeigt, dass Eco RI verdaute Drosophila DNA in neun tRNA₄^{Glu}-Gene enthaltende Fragmente von unterschiedlicher Länge aufgetrennt wird. Jede der neun Fraktionen weist eine ähnliche autoradiographische Intensität auf, was auf gleiche Anzahl Gene pro Restriktionsfragment schliessen lässt. Da jedoch die Uebertragung sehr kleiner und sehr

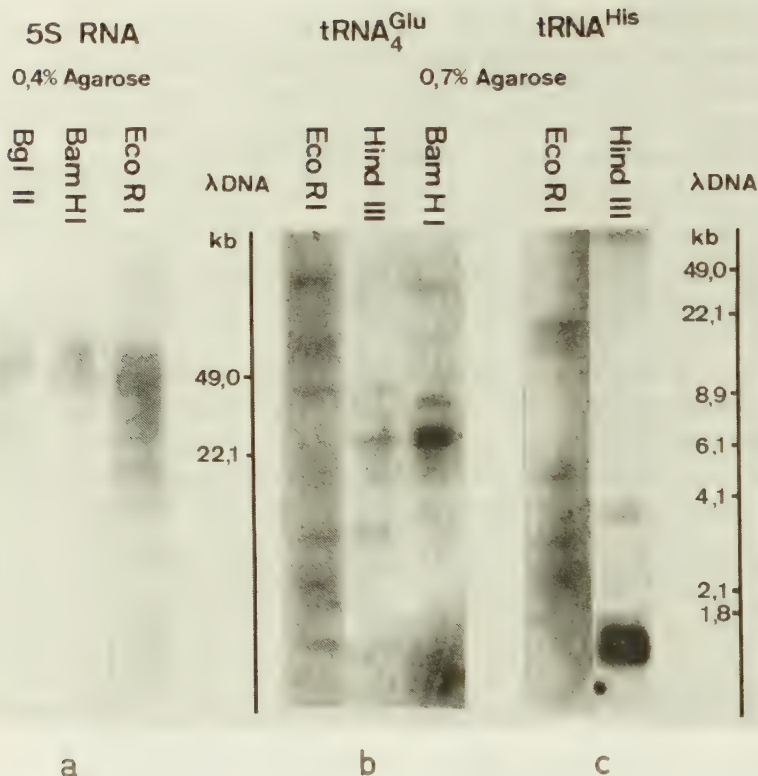


Abb. 12: Restriktionsanalyse von Drosophila Genom-DNA.

Fünf µg DNA wurden mit den über den einzelnen Bahnen angegebenen Restriktions-Endonukleasen verdaut. Die resultierenden Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrocellulosefilter übertragen und gegen eine ioditierte RNA-Probe hybridisiert. Hind III Restriktionsfragmente von λPhagen DNA dienten als MG-Marker. Die Abbildung zeigt die Hybridisierungsdaten mit ¹²⁵I -5S RNA (a) mit ¹²⁵I - tRNA^{Glu}₄ (b) und ¹²⁵I -tRNA^{His} (c).

grosser DNA-Fragmente von Agarosegelen auf Nitrocellulosefilter quantitativ und qualitativ unterschiedlich sein kann (Nagamine et al., 1980), werden Interpretationen dieser Art problematisch. Es lässt sich daher nicht schlüssig folgern, dass die markierten Banden gleich viele tRNA-Gene enthalten. Verdauungen mit Hind III und Bam HI zeigen drei resp. vier markierte Banden. Da die Sequenz der tRNA₄^{Glu} keine Erkennungssignale der Restriktions Endonuklease Eco RI aufweist (Altwegg und Kubli, 1980), darf eine minimale Zahl von neun tRNA₄^{Glu}-Genen im Genom von Drosophila melanogaster angenommen werden.

Verdauungen mit Hind III und Eco RI resultieren in drei resp. sieben tRNA^{His} spezifischen Banden (Abb. 12c). Transfer-RNA^{His}-Gene enthalten im TΨC-Loop eine Sequenzfolge, die von Hind III aber nicht von Eco RI erkannt wird (Altwegg und Kubli, 1980). Die minimale Zahl der tRNA^{His}-Gene kann mit sieben angegeben werden.

DISKUSSION

Transfer-RNA-Gene liegen im Genom von Eukaryonten in allen bekannten Fällen in redundanter Form vor, das heisst, die Anzahl tRNA-Gene übersteigt die Anzahl verschiedener tRNA-Sequenzen um ein Vielfaches (Long und Dawid, 1980). Daten über ihre Organisation sind bis heute allerdings spärlich. Zu den best untersuchten Organismen gehören Hefe (Saccharomyces cerevisiae), der afrikanische Krallenfrosch Xenopus laevis und seit jüngerer Zeit auch Drosophila melanogaster.

Bei Hefe sind die rund 360 Gene über das ganze Genom verteilt. Für tRNA^{Tyr}_{Hefe} konnte gezeigt werden, dass die acht Gene auf unabhängigen DNA-Abschnitten an verschiedenen Stellen des Genoms liegen (Olson et al., 1977). Mit einer Ausnahme enthalten die acht tRNA spezifischen DNA-Fragmente keine weiteren tRNA-Gene (Olson et al., 1979). Eine unterschiedliche Organisation scheint dagegen bei Xenopus laevis realisiert zu sein. Arbeiten von Clarkson und Kurer (1976) sowie von Clarkson et al., (1978) zeigen, dass die etwa 300 tRNA^{Met}₁-Gene von X. laevis vermutlich in einer Region des Genoms in regelmäßigen, repetitiven Einheiten zusammengefasst sind, da sich die tRNA^{Met}₁ im EcoI-Hinf-Digest von tRNA^{Met}₄ und tRNA^{Val} trennen lässt. Jüngste Daten zeigen allerdings, dass dieser tRNA^{Met}₁-Gencluster mindestens noch weitere acht tRNA-Sequenzen enthalten muss (Müller und Clarkson, 1980; Clarkson, pers. Mitteilung). "In situ" Hybridisierung von tRNA an Chromosomen zweier Salamarten (Ambystoma granulosa und Ambystoma wrighti) deckten nur je einen einzigen chromosomalen tRNA-Locus auf (León, 1976). Eine ioditierte tRNA-Fraktion markierte das eine Ende des metazentrischen Chromosoms No 5 von A. granulosa und eine Stelle des 3. Chromosoms von A. wrighti. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und ähnliche Untersuchungen anderer

Laboratorien zeigen jedoch, dass Amphibien in dieser Beziehung eher zu den Ausnahmen gehören.

Einen Einblick in die 600 - 700 tRNA-Gene von Drosophila melanogaster (Ritossa et al., 1966; Weber und Berger, 1976) konnte erst durch die elegante Methode der "in situ" Hybridisierung von "in vitro" iodierten tRNA-Proben an polytäre Speicheldrüsenchromosomen gewonnen werden (Gall und Pardue, 1969; John et al., 1969). Drosophila bietet hier den Vorteil, dass die Organisation bestimmter Gene auf der Stufe des gesamten Genoms untersucht und sichtbar gemacht werden kann, wobei die detaillierte Kartierung der Speicheldrüsenchromosomen (Lindsley und Grell, 1972) eine genaue cytologische Lokalisation der markierten Regionen erst möglich macht.

Erste Hybridisierungsversuche mit ^{125}I -tRNA $^{\text{Glu}}_4$ zeigten erstaunliche Ergebnisse. Sequenzen dieses einen Isoakzeptors konnten in mehreren Regionen (52F, 56EF und 62A) auf verschiedenen Chromosomen (2L und 2R) nachgewiesen werden. Die Resultate von Arbeiten anderer Autoren (Elder, 1978; Hayashi et al., 1980) und eigene weitere Versuche mit tRNA $^{\text{Asp}}_{20}$ (29D und 29E), tRNA $^{\text{Asn}}_{57}$ (42A, 59F, 60C und 84F), tRNA $^{\text{His}}_{48}$ (48F und 56E) und tRNA $^{\text{Ala}}_{57}$ (63A und 90C) bestätigen, dass einzelne Isoakzeptoren dispers über das ganze Genom von Drosophila melanogaster verteilt sein können. Andererseits ist es aber auch möglich, dass verschiedene tRNA's wie tRNA $^{\text{Glu}}_4$ und tRNA $^{\text{Lys}}_2$ (62A; Hayashi et al., 1980) oder tRNA $^{\text{Asn}}_{57}$ und tRNA $^{\text{Arg}}_2$ (42A; Elder, 1978) in derselben Region lokalisiert sind.

Die Methode der "in situ" Hybridisierung erlaubt die genaue Lokalisation einer bestimmten Sequenz meist nur innerhalb ganzer chromosomaler Regionen, da das Auflösungsvermögen der anschliessenden Autoradiographie relativ gering ist. In seltenen Fällen kann die Markierung bestenfalls einzelnen cytologischen Banden zugesprochen werden. Ob entsprechende Isoak-

zeptoren (z.B. $\text{tRNA}_{57}^{\text{Asn}}$ und $\text{tRNA}_2^{\text{Arg}}$) auf eng benachbarten Banden, in getrennten Gruppen auf einem DNA-Abschnitt einer einzigen Bande oder gegenseitig durchmischt im selben Gencluster vorliegen, lässt sich nur mittels Analyse auf DNA-Niveau entscheiden. Untersuchungen mehrerer Drosophila DNA-Fragmente, die möglicherweise den ganzen tRNA-Gencluster der chromosomalen Region 42A umfassen, zeigen, dass der letztere Fall bei Drosophila melanogaster tatsächlich realisiert ist (Yen et al., 1979). Die einzelnen, klonierten DNA-Fragmente, die in ihrer Gesamtheit einen 46 kb langen DNA-Abschnitt beschreiben, enthalten mindestens 18 tRNA-Gene. Mehrere tRNA^{Asn} -, $\text{tRNA}_2^{\text{Arg}}$ - und $\text{tRNA}_2^{\text{Lys}}$ -Sequenzen liegen, gegenseitig durchmischt, in unregelmässigen Abständen auf beiden DNA-Strängen vor (Yen et al., 1979).

Bis heute sind die Gene von etwa 20% aller Drosophila tRNA-Isoakzeptoren lokalisiert worden und die Ergebnisse lassen sich wie folgt kurz zusammenfassen: 1. Die Loci verteilen sich über das gesamte Genom von Drosophila melanogaster mit Präferenz der Autosomen zwei und drei. Hybridisierung mit Gesamt-tRNA zeigt zusätzliche Markierung einzelner Regionen des X-Chromosoms, doch konnten auf dem vierten Chromosom noch keine tRNA-Loci nachgewiesen werden (Elder et al., 1980). 2. Ein tRNA-Isoakzeptor kann an mehreren cytologischen Stellen lokalisiert werden, wobei aber 3. auch verschiedene tRNA-Isoakzeptoren in derselben Region zu finden sind. Eine Systematik der Anordnung lässt sich nicht erkennen. Selbst in dieser Arbeit untersuchten Q-Basen haltigen Isoakzeptoren der tRNA^{His} , tRNA^{Asn} und tRNA^{Asp} können weder in derselben noch in benachbarten Regionen lokalisiert werden - ihre Verteilung ist ohne sichtbare Gesetzmässigkeit.

Gene einzelner tRNA-Isoakzeptoren von Drosophila liegen im Durchschnitt 10 - 13fach redundant vor. Versuche von Tener et al. (1979), die Anzahl der Gene individueller tRNA-Spe-

zies mittels konventioneller RNA:DNA-Sättigungshybridisierung zu bestimmen, führten zu keinem Ergebnis, da sich die Sättigungswerte trotz hohem tRNA-Ueberschuss als Funktion der tRNA-Konzentration erwiesen. Genzahlen, die durch "in situ" Hybridisierung bestimmt worden sind (Elder et al., 1980), haben lediglich approximativen Charakter, da wichtige Parameter der Reaktion, wie z.B. die DNA-Konzentration, nur schwer zu kontrollieren sind. Weitere Information über den Redundanzgrad einzelner tRNA-Gene kann durch Restriktionsenzymverdauungen von Genom-DNA und anschliessender Identifikation der resultierenden, tRNA-Sequenzen enthaltenden DNA-Fragmente nach der Methode von Southern (1975) gewonnen werden (Olson et al., 1977). In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde die Zahl der tRNA^{Glu}-Gene mit neun und der tRNA^{His}-Gene mit sieben pro haploides Genom bestimmt. Aus folgenden Gründen muss es sich dabei aber um minimale Werte handeln. Die verwendeten Versuchsbedingungen lassen keine Aussage über die Häufigkeit einzelner tRNA-Gene pro DNA-Restriktionsfragment zu. Vergleiche der Intensität einzelner Banden weisen nur auf eine gleiche Anzahl Gene pro Fragment hin. Es kann daher nicht mit Sicherheit entschieden werden, ob ein DNA-Fragment eine oder mehrere Sequenzen einer bestimmten tRNA enthält. Transfer-RNA-Gene aus verschiedenen Regionen des Drosophila-Genoms können in Fragmenten von ähnlicher Länge liegen und daher elektrophoretisch nicht aufgetrennt werden. Weiter werden kleine DNA-Fragmente mit geringer Effizienz auf Milliporefilter übertragen und können mittels Hybridisierung nur schlecht erfasst werden und die Anordnung einzelner tRNA-Gene kann zu Sekundärstrukturen der DNA führen, die einen Teil der komplementären Sequenzen für die Hybridisierung mit ¹²⁵I-tRNA unzugänglich macht (Hovemann et al., 1980).

Die Signifikanz von Hybridisierungsdaten hängt im wesentlichen von der Reinheit der verwendeten RNA-oder DNA-Probe, den jeweiligen Reaktionsbedingungen und der Spezifität der

Hybridisierungsreaktion ab. Die im Abschnitt "Resultate" diskutierten Ergebnisse der Amionacylierung, der Fingerprintanalysen, der Polyacrylamidgelelektrophorese und der RPC-5 Chromatographie zeigen, dass die in dieser Arbeit verwendeten ^{125}I -tRNA-Proben in hohem Masse als rein betrachtet werden dürfen. Dennoch können Spuren von kontaminierender ^{125}I -RNA, die bei ungünstigen Hybridisierungsbedingungen Markierung über einzelnen, chromosomalen Regionen hervorrufen, nicht ausgeschlossen werden. Um Fehlerquellen dieser Art zu minimalisieren, wurden die Hybridisierungsreaktionen unter möglichst restriktiven Bedingungen (hohe Temperatur, niedriger R_0 -Wert) durchgeführt (Szabo et al., 1977). Hier ist zu erwähnen, dass mit Ausnahme von 25D, 59F und 60C alle in dieser Arbeit beschriebenen Regionen von Elder et al. (1980) durch Hybridisierung von unfractionierter ^{125}I -tRNA ebenfalls als tRNA-Regionen identifiziert werden konnten.

Die Frage nach der Spezifität der Hybridisierungsreaktion erhält bei Versuchen mit Drosophila melanogaster tRNA eine besondere Bedeutung. Vergleiche der tRNA codierenden Abschnitte des Plasmids pCIT 12 zeigen erstaunliche DNA-Sequenzhomologien verschiedener tRNA-Spezies (Hovemann et al., 1980). Zwei Regionen der tRNA^{Ile} sind zwei Abschnitten der tRNA^{Lys}-Sequenz zu 93% homolog; die beiden "verwandten" Regionen bilden 66% dieser zwei tRNA-Gene. Die Homologien zwischen den Genen der tRNA^{Ile} und der tRNA^{Asn} sind weniger ausgeprägt (71%), doch handelt es sich hier um mehr als 62 Nukleotide ($\approx 85\%$) der tRNA-Sequenz, die diese Ähnlichkeiten aufweisen. Einen direkten Nachweis von Kreuzhybridisierung konnten die Autoren erbringen, in dem sie zeigten, dass gereinigte, radioaktiv markierte tRNA^{Asn} an DNA-Fragmente hybridisiert werden konnte, die nur die tRNA^{Ile}-Sequenzen enthielten. Das von Hosbach et al. (1980) charakterisierte Plasmid TR 13 enthält ein 1,7 kb DNA-Fragment der cytologischen Region 62A. DNA-Sequenzanalysen von TR 13 und einem überlappenden Fragment (TR 113) zeigten, dass sich in dieser Region auf einem etwa 7,2 kb DNA-Abschnitt fünf tRNA^{Glu}-Gene befinden, die sich in sechs Nukleotiden von tRNA₄^{Glu} unterscheiden (Altwegg, 1980;

Altwegg und Kubli, 1980). Bei einer der sechs Basensubstitutionen handelt es sich um eine Transition U→C an der ersten Stelle im Anticodon. Ob nun die Region 62A lediglich auf Grund von Kreuzhybridisierung als tRNA^{Glu}₄-Locus identifiziert worden ist, bleibt unklar. Allerdings steht fest, dass durch Hybridisierung von Gesamt-tRNA an TR 13 und TR 113 eine tRNA^{Glu}₄-Fraktion (!) isoliert werden kann (Hosbach et al., 1980). Auf dem untersuchten DNA-Abschnitt konnten aber keine Sequenzen der tRNA^{Lys}₂ gefunden werden, obschon tRNA^{Lys}₂-Gene in der Region 62A erwartet werden dürfen (Hayashi et al., 1980). Offenbar umfasst der von Hosbach et al. (1980) beschriebene DNA-Abschnitt nicht den vollständigen tRNA-Gencluster der Region 62A. Transfer-RNA^{Glu}₄-Gene in unmittelbarer Nähe von TR 13 und TR 113 sind deshalb nicht auszuschliessen. Diese Beispiele machen deutlich, dass bei Genlokalisierungen durch "in situ" Hybridisierung mit ¹²⁵I-tRNA allein Fehlinterpretationen nie ganz ausgeschlossen werden dürfen. Durch Hybridisierung mit markierter DNA, die zusätzlich zu den tRNA codierenden noch flankierende Sequenzen enthielt, liessen sich jedoch einige der hier beschriebenen tRNA-Loci verifizieren. Das Plasmid pCIT 12 (Yen et al., 1977) enthält mindestens acht tRNA-Gene, wobei drei davon für tRNA^{Asn} codieren; "in situ" Hybridisierung von pCIT 12 zeigt Markierung über 42A (2R). Das Plasmid p14C4 enthält neben tRNA^{Arg}₂ auch tRNA^{Asn}-Gene und hybridisiert an die Region 84F (Dudler et al., 1980). Beide Loci werden ebenfalls mit ¹²⁵I-tRNA^{Asn}_{5y} markiert. Ein Übereinstimmender Locus (48F) wurde auch für das ein tRNA^{His}-Gen enthaltende Plasmid p38B10 gefunden (Dudler et al., 1980). Im Gegensatz zu pCIT 12 erfolgte die Charakterisierung der tRNA codierenden Sequenzen von p14C4 und p38B10 nicht anhand der DNA-Sequenz direkt. Hybridisierung von ³²P markierter Gesamt-tRNA an die beiden Plasmiden p14C4 und p38B10 resultierte aber in der Selektion von chromatographisch reiner ³²P-tRNA^{Arg}₂ und ³²P-tRNA^{Asn} im einen und von ³²P-tRNA^{His} im letzteren Fall (Dudler et al., 1980). Kreuzhybridisierende tRNA-Spezies wie bei Hosbach et al., 1980) wurden keine nachgewiesen.

Mit der Methode der "in situ" Hybridisierung lassen sich komplementäre Sequenzen der verwendeten RNA- oder DNA-Proben im Genom von Drosophila aufdecken. Dabei darf nicht ausser acht gelassen werden, dass damit nichts über die "in vivo" Funktion und die Vollständigkeit dieser Gene ausgesagt werden kann. Sequenzanalysen von Xenopus laevis Oozyten 5S DNA haben gezeigt, dass 5S DNA-Sequenzen existieren, die sich in 15 Nukleotiden von den 5S RNA-Genen unterscheiden und mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht transkribiert werden (= Pseudogene; Jacq et al., 1977; Miller et al., 1978). Folgende Beispiele sollen verdeutlichen, dass im Genom von Drosophila derartige Pseudogene nicht auszuschliessen sind. Das Plasmid TR 13 trägt drei tRNA^{Glu}-Gene, wobei das mittlere eine Basensubstitution im Akzeptorstamm aufweist (Hosbach et al., 1980). Ob beide Sequenzen für funktionelle tRNA-Moleküle codieren, ist nicht klar, da die cytoplasmatischen RNA-Sequenzen nicht ermittelt sind. DNA-Sequenzierungsdaten von D.Söll (pers. Mitteilung) deckten eine Region des Drosophila-Genoms auf, die keine vollständigen, sondern eine Reihe von tRNA^{Met}-Gen-Bruchstücken enthält. Da die Teilsequenzen in mehreren Fällen überlappend sind, dürfte es sich dabei nicht um tRNA-Gene handeln, die durch Intron-Sequenzen bruchstückartig aufgesplittert werden.

Bei der Interpretation von "in situ" Hybridisierungsdaten muss immer in Betracht gezogen werden, dass tRNA-Gene, die nur in Einzahl vorliegen, kaum erfasst werden und dass aktive von inaktiven Sequenzen nicht zu unterscheiden sind. Das gilt zum Beispiel bei Versuchen, bekannte tRNA-Loci mit den Minute-Mutanten von Drosophila melanogaster zu korrelieren. Minutes sind eine Klasse von etwa 40, über das ganze Genom von Drosophila verteilten, dominanten Mutationen. Im heterozygoten Zustand bewirken sie verlangsamte Entwicklung, gestörtes Wachstum und oft reduzierte Viabilität der Fliegen. Weiter beinhalten ihre phänotypischen Merkmale neben verkürzten, dünnen Borsten noch andere morphologische Abnormalitäten (Lindsley und Grell, 1972; Lindsley und Sandler et al., 1972). In inte-

ressanten Hypothesen werden sie von Atwood (1968) mit Deletionen von tRNA-Genen und von Huang und Baker (1976) mit Genloci ribosomaler Proteine in Verbindung gebracht. Einige der tRNA-Genloci, die in dieser Arbeit ermittelt worden sind, decken sich mit Minutes (42A, 48F, 56E, 63A), andere nicht. Selbst unter Berücksichtigung aller bis heute bekannten tRNA-Loci kann eine Übereinstimmung lediglich als zufällig betrachtet werden (Elder et al., 1980). Während aber "in situ" Hybridisierung DNA-Abschnitte mit komplementären Sequenzen aufdeckt, stellen Minute-Mutanten nach der Hypothese von Atwood (Ritossa et al., 1966b) Deletionen dar, die unter anderem aktive tRNA-Gene betreffen - ein hohes Mass an Übereinstimmung ist folglich nicht unbedingt notwendig. Vor kurzem wurde der cytologische Locus (99D) eines ribosomalen Proteins von Drosophila melanogaster bestimmt (Vaslet et al., 1980). Dabei handelt es sich um dieselbe Region, in der die Minute-Mutante M(3)1 genetisch lokalisiert worden ist (Lindsley und Gell, 1972). Das Zustandekommen eines Minute-Phänotyps lässt sich mit einer ungenügenden Anzahl tRNA-Sequenzen und fehlenden Genen ribosomaler Proteine erklären. Eine deutliche Korrelation von tRNA-Genloci und Minute-Mutanten ist nicht zwingend.

Wird die Expression der tRNA-Gene von Drosophila melanogaster räumlich und zeitlich koordiniert, setzt ihre disperse Verteilung äusserst komplexe Kontrollmechanismen voraus. Mögliche Kontrollsequenzen auf Stufe der DNA sind von Hovemann et al. (1980) andeutungsweise gefunden worden. Andere Daten, die die kontrollierte Expression von tRNA-Genen betreffen, stammen aus Arbeiten von Dunn et al. (1979). Eine heterozygote Duplikation der Region 84D (= tRNA_{3b}^{Val}-Locus) erhöht die gesamte Valin Akzeptoraktivität und gleichzeitig auch das Konzentrationsverhältnis $[tRNA_{3b}^{Val}]:[tRNA_4^{Val}]$. Eine entsprechende heterozygote Defizienz dagegen reduziert das Verhältnis $[tRNA_{3b}^{Val}]/[tRNA_4^{Val}]$, nicht aber die gesamte Valin Akzeptoraktivität. Die Konzentration einer bestimmten tRNA-Spezies

scheint Funktion der Anzahl ihrer Gene zu sein, doch übergeordnete Faktoren kontrollieren offenbar die Gesamtproduktion der betreffenden tRNA-Familie. In ähnlicher Weise lassen sich die Ergebnisse von Untersuchungen der tRNA^{Glu}-Isoakzeptoren der Mutante "letal-meander" (1(2)me, 2-72±) interpretieren (Kubli, 1978). Obschon das Isoakzeptorenmuster von homozygoten Larven eine deutlich reduzierte Fraktion der tRNA₄^{Glu} aufweist, ist die gesamte Glutaminsäure Akzeptoraktivität nicht vermindert. In diesem Falle steht eine direkte Korrelation des genetischen Locus von 1(2)me und dem cytologischen Locus der tRNA₄^{Glu} noch aus.

Antworten auf die Frage nach der Bedeutung der dispersen Verteilung der tRNA-Gene von Drosophila melanogaster sind vorderhand noch spekulativ. Die Möglichkeiten differentieller Regulation von repetitiven Gen-Familien, deren Mitglieder in "Gen-Paketen" über das ganze Genom von Drosophila verteilt sind, werden diskutiert (Finnegan et al., 1978). Analysen der tRNA-Gene enthaltenden, chromosomalen Regionen auf der Stufe der DNA-Sequenz sind notwendig. Weiter muss nach Möglichkeiten gesucht werden, aktive tRNA-Sequenzen von inaktiven unterscheiden zu können. Mit vergleichenden Untersuchungen der Verteilungsmuster der "in vivo" aktiven tRNA-Gene verschiedener Gewebe und unterschiedlicher Entwicklungsstadien lassen sich möglicherweise Lösungen dieses Problems finden.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Gereinigte tRNA-Isoakzeptoren von Drosophila melanogaster wurden "in vitro" mit Na^{125}I iodiert, "in situ" an polytäne Speicheldrüsenchromosomen hybridisiert und die spezifischen Bindungsorte durch anschliessende Autoradiographie sichtbar gemacht und identifiziert. Die Genloci der folgenden tRNA-Isoakzeptoren konnten so cytologisch bestimmt werden:

Für $\text{tRNA}_4^{\text{Glu}}$ 52F 56EF und 62A.

Für $\text{tRNA}_{20}^{\text{Asp}}$ 29D und 29E.

Für $\text{tRNA}_{57}^{\text{Asn}}$ 42A, 59F, 60C und 84F.

Für tRNA^{His} 48F und 56E.

Für tRNA^{Ala} 62A und 90C.

Die tRNA-Genloci verteilen sich ohne sichtbare Gesetzmässigkeit auf die Autosomen zwei und drei. Bemerkenswerterweise können die Gene einzelner Isoakzeptoren an mehreren Stellen des Drosophila-Genoms lokalisiert werden; in einzelnen, chromosomalen Regionen sind jedoch auch komplementäre Sequenzen verschiedener tRNA-Isoakzeptoren nachzuweisen. Ein Zusammenhang zwischen tRNA-Genloci und vermeintlichen "tRNA-Mutanten" (Minutes) konnte nicht aufgezeigt werden.

Von besonderem Interesse ist die Region 56EF, dem cytologischen Locus der 5S RNA, der tRNA^{His} und der $\text{tRNA}_4^{\text{Glu}}$. Eine Analyse tRNA spezifischer Genom-DNA Restriktionsfragmente zeigte, dass es sich wahrscheinlich um unabhängige RNA-Genclusters handelt, 5S RNA-Gene also nicht von einzelnen tRNA^{His} - oder $\text{tRNA}_4^{\text{Glu}}$ -Genen durchsetzt sind.

Weiter wurden Versuche unternommen, um die minimale Zahl der tRNA^{His} - und $\text{tRNA}_4^{\text{Glu}}$ -Gene abzuschätzen. Mit Restriktionsendonukleasen verdaut Drosophila Genom-DNA wurde dazu auf Agarosegelen aufgetrennt und mit der Southern Transfer-Technik auf

Nitrocellulosefilter Übertragen. Nach Hybridisierung mit ^{125}I -tRNA^{His} und ^{125}I -tRNA₄^{Glu} wurden die tRNA spezifischen DNA-Fragmente autoradiographisch identifiziert. Verdauungen mit Eco RI resultierten in sieben tRNA^{His} spezifischen und neun tRNA₄^{Glu} spezifischen Banden, d.h. mindestens sieben resp. neun Gene der entsprechenden tRNA sind im haploiden Genom von Drosophila melanogaster enthalten.

ABKÜRZUNGEN

RNA	=	Ribonukleinsäure
tRNA	=	transfer Ribonukleinsäure
rRNA	=	ribosomale Ribonukleinsäure
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	=	Aethylendiamintetraessigsäure (Titriplex III)
DEAE	=	Diäthylaminoäthan
DBAE	=	Dihydroxyborylphenyl-succinyl-aminoäthan
PPD	=	2,5 - Diphenyloxazol
POPOP	=	2,2 - p - Phenylen-bis-(5-phenyloxazol)
RPC	=	Reversed-phase Chromatographie
PAA	=	Polyacrylamid
PAGE	=	Polyacrylamidgelelektrophorese
Tris	=	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
kb	=	Kilobasen (=1000 Basen)
MG	=	Molekulargewicht
A ₂₆₀	=	Einheit optischer Dichte, gemessen bei 260 nm 1 A ₂₆₀ -Einheit $\hat{=}$ 40 µg RNA / ml
Asn	=	Asparagin
Asp	=	Asparaginsäure
Arg	=	Arginin
Ala	=	Alanin
Cys	=	Cystein
Glu	=	Glutaminsäure
His	=	Histidin
Ile	=	Isoleucin
Lys	=	Lysin
Phe	=	Phenylalanin
Pro	=	Prolin
Met	=	Methionin
Ser	=	Serin
Thr	=	Threonin
Trp	=	Tryptophan
Tyr	=	Tyrosin
Val	=	Valin

L I T E R A T U R

- Agris, P.P. and Söll, D.: The modified nucleosides in transfer RNA. In: "Nucleic acid-protein interactions". (H.S. Vogel, ed.) pp.321-344. Academic Press, New York. (1977).
- Altwegg, M.: Isolation und partielle Sequenzierung von tRNA^{Glu} und tRNA^{Phe} von Drosophila melanogaster. Diplomarbeit, Universität Zürich, (1977).
- Altwegg, M.: Transfer RNA von Drosophila melanogaster: Ein Beitrag zur Struktur und Evolution. Dissertation, Universität Zürich, (1980).
- Altwegg, M. and Kubli, E.: The nucleotide sequence of glutamate tRNA^{Glu} of Drosophila melanogaster. Nucl.Acids Res. 8, No2: 215-223 (1980).
- Altwegg, M. and Kubli, E.: The nucleotide sequence of histidine tRNA^{Phe} of Drosophila melanogaster. Nucl.Acids Res. 8, No 15: 3259-3262 (1980).
- Artavanis-Tsakonas, S., Schedl, P., Tschudi, C., Pirodda, V., & Gehring, W.: The 5S genes of Drosophila melanogaster. Cell 12: 1057-1067 (1977).
- Ashburner, M. and Novitski, E.: The genetics and biology of Drosophila. Vol 1a, ed, by M.Ashburner and E. Novitski. Academic Press. (1976).
- Atherton, D. and Gall, J.G.: Salivary gland squashes for in situ hybridization studies. Drosophila Inform. Serv. 49: 131-133 (1972).
- Batey, I.L. and Brown, D.M.: Chemical studies of the tertiary structure of transfer RNA. Iodination of exposed cytosine residues with ¹²⁵I. Biochem. Biophys. Acta 474: 378-385 (1977).
- Blatt, B. and Feldmann, H.: Charakterization of precursors to tRNA in yeast. FEBS Letters 37: 129-133 (1973).
- Brownlee, G.G.: Determination of sequences in RNA. Amsterdam-London, North-Holland Publishing Company (1972).
- Carter, G.W. and Van Dyke, K.: Scintillation counting: A comparison of the counting efficiencies of several aqueous solubilizers. Anal.Biochem. 54: 624-627 (1973).

- Clarkson, S.G. and Kurer, V.: Isolation and some properties of DNA coding for tRNA^{Met} from Xenopus laevis. Cell 8: 183-195 (1976).
- Clarkson, S.G., Kurer, V. & Smith, H.O.: Sequence organization of a cloned tRNA^{Met} fragment from Xenopus laevis. Cell 14: 713-724 (1978).
- Commerford, S.L.: Iodination of nucleic acids in vitro. Biochemistry 10: 1993-1999 (1971).
- Cortese, R.: The role of tRNA in regulation. In: Biological regulation and development. ed. by R.F. Goldberger, Plenum Press, New York (1979).
- Deutch, C.F., Scrapulla, R.G., Sonnenblick, E.B. & Soffer, R.L.: Pleiotropic phenotype of an *E. coli* mutant lacking leucyl, phenylalanyl-transfer ribonucleic acid-protein transferase. J. Bacteriol. 129: 544 (1977).
- Dickinson, W.J. und Sullivan, D.T.: Gene-enzyme systems in Drosophila. pp. 163 Springer, Berlin, Heidelberg, New York. (1975).
- Dudler, R.: Isolation von Isoakzeptoren der Glycin-transfer-Ribonukleinsäure von Drosophila melanogaster. Diplomarbeit, Universität Zürich, (1977).
- Dudler, R., Egg, A.H., Kubli, E., Artavanis-Tsakonas, S., Gehring, W., Stewart, R. & Schedl, P.: Transfer RNA genes of Drosophila melanogaster. Nucl. Acids Res. 8, No 13: 2921 (1980).
- Dunn, R., Hayashi, S., Gillam, I.C., Delaney, A.D. & Tener, G.M.: Genes coding for valine transfer ribonucleic acid 3b in Drosophila melanogaster. J. Mol. Biol. 128: 277-287 (1979).
- Egg, A.H.: Eine vergleichende Analyse der tRNA und 5S rRNA bei der Letalmutante l(3)tr und dem Wildtyp von Drosophila melanogaster. Dissertation, Universität Zürich, (1978).
- Elder, R.T.: Genes for a single transfer RNA are present at two chromosomal sites in Drosophila melanogaster. Fed. Proc. 37: 1732 (1978).
- Elder, R.T., Szabo, P. & Uhlenbeck, O.: 4S RNA gene organization in Drosophila melanogaster. In: "Transfer RNA" (J. Abelson, P.R. Schimmel, D. Söll, eds.) Cold Spring Harbor Laboratory (1980).

- Finnegan, D.J., Rubin, G.M., Young, M.W. & Hogness, D.S.: Repeated gene families in Drosophila melanogaster. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42: 1053-1063 (1978).
- Flamm, W.G., Birnstiel, M.D. & Walker P.M.B.: Isopycnic centrifugation of DNA. Methods and application. In: Subcellular components. 279-310, London, Butterworth (1969).
- Gall, J.G. and Pardue, M.L.: Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 63: 378-383 (1969).
- Gallant, J. and Lazzarini, R.A.: The stringent control. In: Proteinsynthesis. A series of advances, Vol.2 ed. E.H.McConkey, pp. 309-359, Marcel Dekker, New York (1976).
- Garel, J.P., Mandel, P., Chavancy, G. & Dallin, J.: Functional adaption to fibroin biosynthesis in the silk-gland of Bombyx mori. FEBS Letters 7: 327 (1970).
- Gehring, W.J.: Developmental genetics of Drosophila. Ann. Rev. Genet. 10: 209-252 (1976).
- Genter, H. and Berg, P.: Occurrence of a glycyl-lipopolysaccharide structure in Escherichia coli and its enzymatic formation from glycyl-tRNA. Fed.Proc. 30: 1218 (1976).
- Gould, H. and Matthews, H.R.: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. ed. T.S.Work and E.Work. North-Holland/American Elsevier (1976).
- Grigliatti, T.A., White, B.N., Tener, G.M., Kaufman, T.C. & Suzuki, D.T.: The localization of transfer RNA^{lys} genes in Drosophila melanogaster. Proc.Nat. Acad.Sci. (Wash.) 71: 3527-3531 (1974).
- Grosjean, H., Takada, C. & Petre, J.: Complex formation between tRNAs with complementary anticodons: use of matrix bound tRNA. Biochem. Biophys. Res. Comm. 53: 882-893 (1973).
- Grosjean, H.J., de Henau, S. & Crothers, D.M.: On the physical basis for ambiguity in genetic coding. Proc.Nat. Acad.Sci. (Wash.) 75: 610-614 (1978).
- Grummt, F. and Grummt, I.: Studies on the role of uncharged tRNA in the pleiotypic responses of animal cells. Europ. J.Biochem. 64: 307 (1976).

- Harada, F. and Nishimura, S.: Possible anticodon sequences of tRNA^{His}, tRNA^{Asn} and tRNA^{ASP} from Escherichia coli B. Universal presence of nucleoside Q in the first position of the anticodons of these transfer ribonucleic acids. Biochemistry **11**:301-308 (1972).
- Haseltine, W.A., Maxim, A.M. & Gilbert, W.: Rous sarcoma virus genom is terminally redundant. The 5' sequence. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **74**: 889 (1977).
- Hayashi, S., Gillam, I.C., Delaney, A.D. & Tener, G.M.: Acetylation of chromosome squashes of Drosophila melanogaster decreases the background in autoradiographs from hybridization with ¹²⁵I-labeled tRNA. J. Histochem. Cytochem. **26**: 677-679 (1978).
- Hayashi, S., Gillam, I.C., Delaney, A.D., Dunn, R., Tener, G.M., Grigliatti, T.A., Suzuki, D.T.: Hybridization of tRNAs of Drosophila melanogaster to polytene chromosomes. Chromosoma **76**: 65-84 (1980).
- Hershey, N.D., Conrad, S.E., Sodja, A., Yen, P.H., Cohen, M., Davidson, N., Ilgen, C. & Carbon, J.: The sequence arrangement of Drosophila melanogaster 5S DNA cloned in recombinant plasmides. Cell **11**: 585-589 (1977).
- Hosbach, H.: Vergleich der Aminoacylierung und der Isoakzeptorenmuster der tRNA junger und alter Fliegen von Drosophila melanogaster. Dissertation, Universität Zürich, (1977).
- Hosbach, H. and Kubli, E.: Transfer RNA in aging Drosophila: II. Isoacceptor patterns. Mech. Ageing Dev. **10**: 141-149 (1979).
- Hosbach, H., Silberklang, M. & McCarthy, B.J.: Evolution of a Drosophila melanogaster glutamate tRNA gene cluster. Cell, in press (1980).
- Hovemann, B., Sharp, S., Yamada, H. & Söll, D.: Analysis of a Drosophila tRNA gene cluster. Cell **19**: 889-898 (1980).
- Huang, S.L. and Baker, B.S.: The mutability of the Minute loci of Drosophila melanogaster with ethyl methanesulfonate. Mut. Res. **34**: 407-414 (1976).
- Jacq, C., Miller, J.R. & Brownlee, G.G.: A pseudogene structure in the 5S DNA of Xenopus laevis. Cell **12**: 109-120 (1977).

- John, H.A., Birnstiel, M.L. & Jones, K.W.: RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature (Lond.)* 223: 582-587 (1969).
- Kaufman, T.C.: Alleles of the giant locus of Drosophila melanogaster. *Genetics (Suppl.)* 71: 28-29 (1971).
- Kern, H.: Fractionation of nucleic acids with special regard to rapidly labeled RNA. *Anal. Biochem.* 67: 147-156 (1975).
- Kirby, J.D.: A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *Biochem. J.* 64: 405-408 (1956).
- Kubli, E.: Der Letalfaktor 1(2)me von Drosophila melanogaster: Eine Deletion für tRNA Gene? *Rev. Suisse Zool.* 85: 790-795 (1978).
- La Rossa, R. and Söll, D.: Other functions of tRNA. In "Transfer RNA" (ed. S. Altman) pp. 136-167. MIT Press, Cambridge, Mass. and London, (1978).
- Laskey, R.A. and Mills, A.D.: Enhanced autoradiographic detection of ³²P and ¹²⁵I using intensifying screens and hypersensitized film. *FEBS Letters* 82: 314-316 (1977).
- León, P.E.: Molecular hybridization of iodinated 4S, 5S and 18S + 28S RNA to Salamander chromosomes. *J. of Cell Biol.* 69: 287-300 (1976).
- Lin, V.K. and Agris, P.F.: Alterations in tRNA isoaccepting species during erytroid differentiation of the Friend Leukemia cell. *Nucl. Acids Res.*, in press, (1980).
- Lin, V.K., Farkas, W.R. & Agris, P.F.: Specific changes in Q-ribonukleosides containing transfer RNA species during Friend Leukemia cell erytroid differentiation. *Nucl. Acids Res.* in press, (1980).
- Lindsley, D.L. and Grell, E.H.: Genetic variations of Drosophila melanogaster. Carnegie Inst. Wash. Publ. 627 (1972).

- Lindsley, D.L. and Sandler, L. & Baker, B.S., Carpenter, A.T.C., Denell, R.E., Hall, J.C., Jacobs, P.A., Miklos G., Davis, B.K., Gethmann, R.C., Hardy, R.W., Hessler, A., Miller, S.M., Nazawa, H., Parry, D.M. & Gould-Somero, M.: Segmental aneuploidy and the genetic gross structure of the Drosophila genom. Genetics 71: 157-184 (1972).
- Long, E.D. und Dawid, I.B.: Repeated genes in eucaryots. Ann. Rev.Biochem. 49: 727-764 (1980).
- Lund, E. Dahlberg, J.E., Lindahl, L., Jaskunas, S.R., Dennis, P.P., Nomura, M.: Transfer RNA genes between 16S and 23S rRNA genes in rRNA transcription units of E.coli. Cell 7: 165-177 (1976).
- Matouschek, M.: Untersuchungen über den Einbau von ³²P-Phosphat in die niedermolekularen RNS von vier Drosophila melanogaster Zelllinien. Diplomarbeit, Universität Zürich, (1979).
- McCutchan, T.F., Gilham, P.T. & Söll, D.: An improved method for the purification of tRNA by chromatography on dihydroboryl substituted cellulose. Nucl.Acids Res. 2: 853-864 (1975).
- Miller, J.R., Cartwright, E.M., Brownlee, G.G. & Fedoroff, N.V., Brown, D.D.: The nucleotide sequence of oocyte 5S DNA in Xenopus laevis. II, The GC-rich region. Cell 13: 717-725 (1978).
- Müller, F. and Clakson, S.G.: Nucleotide sequence of genes coding for tRNA^{Phe} and tRNA^{Tyr} from a repeating unit of Xenopus laevis DNA. Cell 19: 345-353 (1980).
- Nagamine, Y., Sentenac, A. & Fromageot, P.: Selective blotting of restriction fragments on nitrocellulose membranes at low salt concentrations. Nucl.Acids Res. 8, No 11: 2453-2460 (1980).
- Nishimura, S.: Modified nucleosides in tRNA. In: Transfer RNA, (Schimmel, P.R., Söll, D. & Abelson J.N. eds.) Cold Spring Harbor Laboratory (1979).
- Olexa, S.A.: Characterization of a high molecular weight complex of aminoacyl-tRNA synthetases in Drosophila melanogaster. Ph.D.Thesis, Temple University, Philadelphia (1977).
- Okada, N., Shindo-Okada, N. & Nishimura, S.: Isolation of mammalian tRNA^{Asp} and tRNA^{Tyr} by lectin-sepharose affinity column chromatography. Nucl.Acids Res. 4: 415 (1977).

- Olson, M.V., Montgomery, D.L., Hopper, A.K., Page, G.S., Horodyski, F. & Hall, B.D.: Molecular characterization of the tyrosine tRNA genes in yeast. Nature 267: 639-641 (1977).
- Olson, M.V., Hall, B., Cameron, J.R. & Davis, R.W.: Cloning of the yeast tyrosine transfer RNA genes in bacteriophage Lambda. J.Mol.Biol. 127: 285-295 (1979).
- Pardue, M.L. and Gall, J.G.: Nucleic acid hybridization to the DNA of cytological preparations. In: Prescott, D.M., Methods in Cell Biology 10: 1-16 (1975).
- Pearson, R.L., Hancher, C.W., Weiss, J.F., Holladay, D.W. & Kelmers, A.D.: Preparation of crude transfer RNA and chromatographic purification of five transfer RNA's from calf liver. Biochem.Biophys. Acta 294: 236-249 (1973).
- Pongs, O.: tRNA function in protein synthesis. In: "Transfer RNA" (S.Altman ed.) pp. 78-104. MIT Press, Cambridge, Mass. and London, (1978).
- Prensky, W.: The radioiodination of RNA and DNA to high specific activities. In: Prescott, D.M., Methods in Cell Biology 13: 121-152 New York, Academic Press (1975).
- Procunier, J.D. and Tartof, K.D.: Genetic analysis of the 5S RNA genes in Drosophila melanogaster. Genetics 81: 515 (1975).
- Procunier, J.D. and Dunn, R.J.: Genetic and molecular organization of the 5S locus and mutants in D. melanogaster. Cell 15: 1087-1093 (1978).
- Ray, B.K. and Apirion, D.: Identification of RNA molecules which contain 5S ribosomal RNA and transfer RNA in an RNAase E⁻ RNAase P⁻ double mutant strain of Escherichia coli. J.Mol.Biol. 139: 329-349 (1980).
- Rich, A. and RajBhandary, U.L.: Transfer RNA: Molecular structure, sequence and properties. Ann. Rev. Biochem. 45: 805 (1976).
- Ritossa, F.M., Atwood, K.C. & Spiegelman, S.: On the redundancy of DNA complementary to amino acid transfer RNA and its absence from the nucleus organizer region of Drosophila melanogaster. Genetics 54: 663-676 (1966a).

- Ritossa, F.M., Atwood, K.C., Lindsley, D.L. & Spiegelmann, S.: On the chromosomal distribution of DNA complementary to ribosomal and soluble RNA. National Cancer Institute Monograph 23: 449-472 (1966b).
- Roberts, R.J.: Structures of two glycyl tRNA's from Staphylococcus epidermidis. Nature New Biol. 237: 44 (1972).
- Sachs, L.: Angewandte Statistik. p 148. Berlin, Heidelberg, New York: Springer (1974).
- Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517 (1975).
- Spradling, A., Pardue, M.L., & Penman, S.: Messenger RNA in heat-shocked Drosophila cells. J.Mol.Biol. 109: 559-587 (1977).
- Stark, G.R. and Williams, J.G.: Quantitative analysis of specific labelled RNA's using DNA covalently linked to diazobenzyloxymethyl-paper. Nucl. Acids Res. 6: No 1: 195-203 (1979).
- Steffensen, D.M. and Wimber, D.E.: Localization of tRNA genes in the salivary chromosomes of Drosophila by RNA: DNA hybridization. Genetics 69: 163-178 (1971).
- Szabo, P., Elder, R., Steffensen, D.M. & Uhlenbeck, O.C.: Quantitative in situ hybridisation of ribosomal RNA species to polytene chromosomes of Drosophila melanogaster. J.Mol.Biol. 115: 539-563 (1977).
- Tartof, K. and Perry, R.P.: The 5S genes of Drosophila melanogaster. J. Mol. Biol. 51: 171-183 (1970).
- Tener, G.M., Hayashi, S., Dunn, R., Delaney, A., Gillam, I.C., Grigliatti, T.A., Kaufman, T.C. & Suzuki, D.T.: In "Transfer RNA" (J. Abelson, P.R. Schimmel, D. Söll eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, (1980).
- Vaslet, Ch.A., O'Connell, P., Izquierdo, M. & Rosbash, M.: Isolation and mapping of a cloned ribosomal protein gene of Drosophila melanogaster. Nature 285: 674-676 (1980).
- Wahl, G.M., Stern, M., & Stark, G.R.: Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 3683-3687 (1979).

- Weber, L. and Berger, E.: Base sequence complexity of the stable RNA species of Drosophila melanogaster. Biochem. 15: 5511-5519 (1976).
- White, B.N.: An analysis of tRNAs in five Minutes and two suppressors. Dros. Inf. Service 51: 58-59 (1974).
- White, B.N., Tener, G.M., Holden, J. & Suzuki, D.T.: Analysis of tRNAs during the development of Drosophila. Develop. Biol. 33: 185-195 (1973a).
- White, B.N., Tener, G.M., Holden, J. & Suzuki, D.T.: Activity of a transfer RNA modifying enzyme during the development of Drosophila and its relationship to the su(s) locus. J.Mol.Biol. 74: 635-651 (1973b).
- White, B.N. and Tener, G.M.: Chromatography of Drosophila tRNA on BD-cellulose. Can.J.Biochem. 51: 896-902 (1973).
- White, B.N.: Studies on lysine, glutamine and glutamic acid tRNAs from Drosophila. Biochem.Biophys.Acta 395: 322-328 (1975).
- Wimber, B.N. and Steffensen, D.M.: Localization of 5S RNA genes in Drosophila chromosomes by RNA-DNA hybridization. Science 170: 639-641 (1970).
- Yen, P.H., Sodja, A., Cohen, M., Conrad, S.E. & Davidson, N.: Sequence arrangement of tRNA genes on a fragment of Drosophila melanogaster DNA cloned in E.coli. Cell 11: 763-777 (1977).
- Yen, P.H., Hershey D.N., Robinson, R.R. & Davidson, N.: Sequence organization of Drosophila tRNA genes. In: Eucaryotic gene regulation. (Axel, R., Maniatis, T., Fox, C.F. eds.) Academic Press (1979).

C U R R I C U L U M V I T A E

Als Bürger von Zürich und Wetzwil wurde ich, Thomas Schmidt, am 16. November 1943 in Zürich geboren und durchlief hier die Primar- und Sekundarschule. In Küsnacht (ZH) besuchte ich das kant. Unterseminar, das ich 1964 mit der kantonalen Maturität abschloss. Am kant. Oberseminar erwarb ich 1965 das Fähigkeitszeugnis für Primarlehrer und war anschliessend während dreier Jahre in Zürich-Altstetten als Mittelstufenlehrer tätig. In dieser Zeit wurde mir das Wählbarkeitszeugnis für Primarlehrer ausgestellt. Vom Herbst 1968 bis Herbst 1970 hielt ich mich in Kanada auf, wo ich teils in einem Hotel, teils in einer Buchhandlung Arbeit fand. Im Oktober 1970 immatrikulierte ich mich an der Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich und studierte Biologie mit Hauptfach Zoologie. 1976 erwarb ich das Diplom als Naturwissenschaftler. Seit Herbst 1976 bin ich als Forschungsassistent am Zoologischen Institut tätig und führte unter der Leitung von Prof. P.S. Chen und PD Dr. E. Kubli meine Doktorarbeit aus.

Während meiner Studien an der Universität Zürich besuchte ich Vorlesungen und Kurse folgender Dozenten: Baker, Batschelet, Baumgartner, Billeter, Birnstiel, Boesch, Bohren, Burla, Chen, Cook, Eugster, Hadorn, Hagemann, Hampel, Hohl, Jungen, Jungen-Hauschteck, Kubli, Kummer, Leuthardt, Nöthiger, Oswald, Rast, Rohweder, Schmid, Schlittler, Stüssi, Tardent, v.d.Waerden, Wyler, Widmer, Weber, Wehner, Wolfer, Wanner, Weissmann, Wütherich und Ziswiler.

